

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
21. März 2002 (21.03.2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 02/22150 A2

(51) Internationale Patentklassifikation: A61K 38/00

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP01/10541

(22) Internationales Anmeldedatum:
12. September 2001 (12.09.2001)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
100 45 047.4 12. September 2000 (12.09.2000) DE

(71) Anmelder und

(72) Erfinder: KEHREL, Beate [DE/DE]; Schöppingenweg
70, 48149 Münster (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): BRODDE, Martin
[DE/DE]; Alte Landstrasse 5, 48161 Münster (DE).

(74) Anwälte: WEICKMANN, Franz, Albert usw.; Weick-
mann & Weickmann, Postfach 86 08 20, 81635 München
(DE).

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR,
CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE,
GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ,
LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN,
MW, MX, MZ, NO, NZ, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG,
SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN,
YU, ZA, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW),
curasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,
TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK,
ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR),
OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,
ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu
veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe
der PCT-Gazette verwiesen.

WO 02/22150 A2

(54) Title: MEDICAMENT CONTAINING ACTIVATED ANTITHROMBIN III

(54) Bezeichnung: ARZNEIMITTEL ENTHALTEND AKTIVIERTES ANTITHROMBIN III

(57) Abstract: The invention relates to the use of antithrombin III, which is modified in the conformation thereof and which is cited
in the description as activated antithrombin III (IDAAT = immune defense activated antithrombin), as a medicament.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft die Verwendung von in seiner Konformation verändertem Antithrombin III, hier
aktiviertes Antithrombin III (IDATT=immune defence activated antithrombin) genannt, als Arzneimittel.

Arzneimittel enthaltend aktiviertes Antithrombin III

Beschreibung

5

Die Erfindung betrifft die Verwendung von in seiner Konformation verändertem Antithrombin III, hier aktiviertes Antithrombin III (IDAAT = immune defence activated antithrombin) genannt, als Arzneimittel.

10 Antithrombin III ist ein wichtiger physiologischer Gerinnungsinhibitor, welcher, ohne dass es einer vorangehenden Aktivierung bedarf, zirkulierende Serinproteasen inhibiert.

Nach Komplexbildung spaltet die Protease die Arginin 393-Serin 394-
15 Bindung, wodurch es zur Konformationsänderung von Antithrombin und zur Protease-Inhibitor-Komplexbildung kommt. Heparin beschleunigt durch Bindung im aminoterminalen Bereich von Antithrombin III die Antithrombin-Protease-Komplexbildung wesentlich. Es wird angenommen, dass in vivo Glykosaminoglykane, wie Heparansulfat an der Endotheloberfläche die Rolle
20 des Heparins übernehmen.

Antithrombin III gehört zu der über 100 Mitglieder umfassenden Familie der Serinproteaseinhibitoren (Serpine) und ist ein Glykoprotein. Seine 432 Aminosäuren umfassende Polypeptidkette hat ein Molekulargewicht von
25 58000. Das Protein enthält drei intramolekulare Disulfidbrücken und vier Glykosilierungspositionen. In extrem hohen, unphysiologischen Dosen verabreicht, reduziert Antithrombin III im Tierexperiment die Mortalität der Sepsis (Dickneite and Paques, 1993). Bei an Sepsis erkrankten Menschen konnte aber keine signifikante Verbesserung der Mortalität oder Morbidität
30 durch handelsübliche Antithrombin III-Präparate erreicht werden.

- 2 -

Neben der Serinproteasen-, insbesondere Thrombin-hemmenden Wirkung, wurde eine Erhöhung der Prostacyclin-Synthese in humanen und bovinen Endothelzellen durch Antithrombin III beobachtet (Yamauchi et al., 1989). Diese Erhöhung führte zu einer Suppression von Leukozyten (Kainoh et al.,
5 1990) und wird durch Heparin beeinträchtigt (Uchiba et al., 1996), woraus geschlossen wurde, dass diese Wirkung des Antithrombin III über seine Bindung an Heparin-ähnliche Glycosaminoglykan-Rezeptoren vermittelt wird. Stangl et al 1999 beschrieben darüber hinaus eine leichte Steigerung (1.3-1.7-fache) der Freisetzung von Endothelin-1, bzw. Big-Endothelin 1
10 aus Lungengewebe von Ratten durch Antithrombin III.

Antithrombin III wird durch Entzündungs-medierte Prozesse in seiner Form verändert. Die sogenannte „natürliche“, „angeborene“ oder „constitutive“ Immunabwehr ist die erste Verteidigungsstrategie gegen „Eindringlinge“
15 wie Bakterien, Viren, Parasiten etc. und ist im ganzen Tierreich verbreitet. Ein wichtiger Teil dieser ersten Abwehr besteht darin, dass phagozytotische Zellen, insbesondere Monozyten und PMNL (neutrophile Granulozyten), aber auch Dendritische Zellen, Eosinophile, Blutplättchen und Mastzellen allein, oder als Assoziat mit anderen Zellen zum Ort des
20 Eindringens des Pathogens wandern (Chemotaxis) und dabei durch Epithelien und Endothel penetrieren (Diapedese).

Am Ort der Entzündung werden die „Fremdzellen/Eindringlinge“ durch Phagozytose neutralisiert. Die Entzündungszellen setzen dabei Proteasen,
25 wie z.B. Elastase und Cathepsin G und Metalloproteasen und Substanzen frei, die eine Oxidation von Lipiden, Proteinen und Peptiden hervorrufen.

Zu diesen Substanzen gehören O_2 , Superoxid, Hydrogenperoxid, Peroxynitrite, OH^\cdot -Radikale, Hypochlorige Säure HOCl, Cl_2 -Gas, Chloramine.
30 Die Halogenierung (hauptsächlich Chlorierung) ist dabei ein wichtiger Weg, Zellen abzutöten. Im Bereich der Entzündung wird der pH-Wert durch Freisetzung von Milchsäure auf bis unter pH 4.0 erniedrigt.

Die Abwehrzellen setzen auch spezifische Proteine und Peptide zur Abwehr frei, wie „bactericidal/permeability-increasing“ (BPI) Protein aus Thrombozyten und Granulozyten und Defensine aus Granulozyten.

5 Besteht eine Wunde oder sonstige Aktivierung der Hämostase, so entstehen dabei Thrombin, Faktor Xa und andere Serinproteasen. Darüber hinaus kommt es zur Aktivierung von Complement (alternativer Weg, properdinpathway) und zur vermehrten Synthese und Freisetzung von sogenannten „Akute Phase Proteinen“ wie Fibrinogen, C-reaktivem Protein,
10 Mannose-Binding Protein (MBP), Produkten von sogenannten „immediate early genes“ wie Thrombospondin-1, und anderen. Aktivierte Mastzellen setzen lösliches Heparin-Proteoglykan frei, welches an Antithrombin binden kann (Linstead et al., 1992). Antithrombin III wird durch diese Vorgänge indirekt oder direkt verändert und erhält vollkommen neue Funktionen.

15 Im Rahmen der Erfindung wurde festgestellt, dass Antithrombin III, welches durch diese Vorgänge direkt oder indirekt verändert wird, vollkommen neue Funktionen erhält.

20 Im Rahmen der vorliegenden Erfindung wurde weiterhin festgestellt, dass Antithrombin III auch in vitro in diese aktivierte Form überführt werden kann, insbesondere durch Vorgänge wie Oxidation, Behandlung mit Harnstoff und Guanidinhydrochlorid, proteolytische Spaltung, Erwärmung auf 60°C, Erniedrigung des pH auf 4.0 oder Zusatz eines ATIII-Peptides,
25 das die Sequenz SEAAAS enthält. Eine kryptische Sequenz des Antithrombin wird dabei freigelegt und erlaubt dem Protein die Interaktion mit Proteinen wie Thrombospondin, Vitronectin, CD36, oxLDL, $\alpha_v\beta_5$ -Integrin und anderen.

30 Im Rahmen der Erfindung wurde weiter festgestellt, dass aktiviertes Antithrombin III (IDAAT) durch Selbstassoziation polymerisiert. Diese Polymere haben repetitive Bindungsstellen für die anhaftenden Proteine und

- 4 -

immobilisieren diese. Anhaftende Proteine erhalten dadurch Funktionen, die sie als lösliche Proteine im Plasma, Serum oder anderen Körperflüssigkeiten nicht haben und Membranproteine können dadurch zur Signaltransduktion angeregt werden. Einer der wichtigsten Interaktionspartner für IDAAT ist
5 Thrombospondin-1 (TSP-1). TSP-1 ist ein aus multiplen Domänen zusammengesetztes modulares Glykoprotein, welches von vielen Zellen freigesetzt und in die extrazelluläre Matrix eingebaut wird. Insbesondere Blutplättchen enthalten hohe Konzentrationen an TSP-1 (Flicker und Kehrel, 1993) in ihren α -Granula und setzen es während ihrer Aktivierung frei.

10 Dabei steigt die lokale TSP-1-Konzentration um das mehr als 1000fache an (Flicker und Kehrel, 1993). Auch Endothelzellen, glatte Muskelzellen, Gliazellen und Leukozyten sezernieren TSP-1. TSP-1 ist Mitglied der Thrombospondin-Familie, der zusätzlich TSP-2, TSP-3, TSP-4 und das
15 cartilage oligomeric matrix protein (COMP) angehören (Lawler et al., 1993). TSP-1 und TSP-2 sind in einigen Bereichen identisch, sodaß einige TSP-1 Funktionen auch von TSP-2 übernommen werden können. TSP-1 und TSP-2 haben die gleiche Domänen-Struktur und können als Homo- und Heteromere exprimiert werden (Bornstein et al., 1991). TSP-1 ist ein
20 trimeres Glykoprotein mit einer aparenten Masse von 420000 Da. Seine 3 Untereinheiten weisen im Lämmli SDS-PAGE System (Lawler and Hynes 1986) eine molare Masse von 180000 Da auf. Elektronenmikroskopische Bilder zeigen die trimäre Struktur, die wie eine Bola aussieht mit globulären Enden an den Amino- und Carboxytermini der Polypeptidketten (Galvin et
25 al. 1985). In der Nähe der globulären Aminotermini sind die drei Ketten durch Disulfidbrücken miteinander verbunden. Jede TSP-1-Untereinheit enthält 69 Cysteinreste, so dass jede Kette mindestens eine freie SH-Gruppe besitzt. TSP-1 und TSP-2 enthalten ähnliche funktionelle Domänen, wie die N-terminale Region, eine Pro-Kollagen homologe Region, Typ 1 TSP
30 „repeats“ (Wiederholungsbereiche), Typ 2 TSP „repeats“, Typ 3 Calcium-bindende „repeats“ und die Carboxy-terminale Region (Bornstein et al., 1992).

Die stabförmigen Verbindungsregionen der TSP-1 Ketten zeigen eine Calcium-Abhängigkeit der Struktur. In Gegenwart von Ca^{2+} besitzt diese Struktur eine Länge von 16 bis 29.1 nm nach EDTA-Behandlung dagegen von 38.3 nm (Lawler 1986).

5

Die Konformation von TSP-1 ist stark abhängig von der Ca^{2+} -Konzentration (Lawler et al. 1988) und von der Bindung an Interaktionspartner. So verleiht die Bindung von TSP-1 an Fibronectin oder Heparin ihm eine Konformation in Abwesenheit von Ca^{2+} , die das Molekül in Gegenwart von Ca^{2+} einnehmen würde (Dardik and Lahav 1999).

10

Immobilisiertes TSP, adsorbiert an Oberflächen, vermittelt die Adhäsion von Endothelzellen, glatten Muskelzellen und Monozyten. Diese Adhäsion ist abhängig vom Ca^{2+} -Konformationszustand des TSP-1. EDTA-Behandlung inhibiert diesen Vorgang irreversibel (Lawler et al. 1988). Die Ca^{2+} -Form des TSP-1 ermöglicht die Bindung an Zellen RGD-vermittelt über Integrine. Auch die Bindung an CD36 bewirkt eine Konformationsänderung im TSP-1-Molekül (Leung et al 1992). TSP-1 bindet an CD36 über einen zweistufigen Mechanismus. Erst im zweiten Schritt bindet TSP-1 mit hoher Affinität an CD36 über die „cell-binding site“ im Properdin-ähnlichen „Type 1 repeat“.

15

20

Bindung an CD36 über Peptidsequenz 139-155 des CD36 ermöglicht eine Konformationsänderung im TSP-1, welche die hochaffine Bindung an Sequenz 93-110 erlaubt. In diesem Bereich liegt die Sequenz von CD36, deren Bindungsfähigkeit durch Phosphorylierung/Dephosphorylierung (Thr 92) reguliert wird (Asch et al., 1993). Constitutiv phosphoryliertes CD36 bindet Kollagen, durch Zellaktivierung dephosphoryliertes CD36 erhält die Fähigkeit Thrombospondin zu binden. Die Konformation von TSP-1 reguliert seine Funktionsfähigkeit.

25

30

Neben der Fähigkeit an Zellen über Integrine zu binden und Zelladhäsion zu vermitteln, werden auch andere Fähigkeiten, wie z.B. die Fibrinolyse zu modulieren, Elastase und Cathepsin G zu inhibieren, die Wundheilung zu verbessern und das Auswachsen von Neuriten zu fördern, über die
5 Konformation des TSP gesteuert.

TSP-1 defiziente Mäuse entwickeln zwischen der 1. und 4. Lebenswoche extensive akute und chronische organisierte bakterielle Lungenentzündungen mit massiver Einwanderung von Neutrophilen und
10 Makrophagen. Diffuse alveolare Einblutungen wurden beobachtet. Zu einem späteren Infektionszeitpunkt kommt es im Vergleich zu Kontrollmäusen des gleichen Inzuchtstammes, die TSP-1 besitzen, zu einer Verdickung und Kräuselung des Epithels der Luftwege (Lawler et al. 1998).

15 Diese Ergebnisse verdeutlichen die Bedeutung des TSP-1 für die Abwehr von Infektionen. TSP-1 negative Mäuse produzierten signifikant weniger Nachwuchs als Kontrolltiere. TSP-1 „knock outs“ zeigen eine ausgeprägte lordotische Curvatur der Wirbelsäule. Dies zeigt die Bedeutung des TSP-1
20 für die Entwicklung/Stabilisierung des Skeletts. TSP-1 defiziente Tiere hatten eine hochsignifikante höhere Anzahl von Leukozyten, insbesondere Monozyten und Eosinophile im peripheren Blut.

TSP-1 ist ein multifunktionelles Protein. An Oberflächen immobilisiert
25 fördert es die Bildung von Plasmin (Silverstein et al. 1986) und schützt durch Immobilisation gleichzeitig das Plasmin vor Inaktivierung durch den alpha2 Plasmin-Inhibitor. Die hier beschriebene Erfindung, der Einsatz von IDAAT, bewirkt eine Immobilisierung von TSP-1 an Zelloberflächen. Der Urokinase Plasminogen Activator (uPA) und das „signal-chain“ uPA (scuPA)
30 binden an immobilisiertes TSP-1 und bleiben dabei proteolytisch aktiv. Die Bindung an immobilisiertes TSP schützt uPA vor der Inhibierung durch den Plasminogen Activator Inhibitor Typ 1 (PAI-1) (Silverstein et al., 1990).

Bindet scuPA an seinen Rezeptor (scuPAR) so wird eine Bindungsstelle frei, welche die Bindung an Zell-assoziiertes TSP-1 und Vitronectin (Vn) ermöglicht (Higazi et al., 1996). So ermöglicht immobilisiertes TSP-1 proteolytische Prozesse auch in einer Mikroumgebung, in der kein Fibrin
5 vorhanden ist.

Zusammen mit Plasmin aktiviert immobilisiertes TSP-1 den „latent“ transforming growth factor beta 1 (TGF- β -1) auf der Makrophagenoberfläche (Yehualaeshet et al., 1999).

10

Auch auf der Endotheloberfläche aktiviert TSP-1 das TGF- β (Schultz-Cherry and Murphy-Ullrich, 1993, Schultz-Cherry et al., 1994). TGF- β inhibiert die Proliferation von Endothelzellen und wirkt antiangiogenetisch. Inhibierung der Angiogenese durch TSP-1 wurde vielfach beschrieben (Iruela-Arispe et
15 al., 1999, Jiminez et al., 2000). Auch eine Komplexbildung zwischen TSP und FGF- β 1 (basic fibroblast growth factor) ist an dieser Funktion beteiligt (Murphy-Ullrich, 1993). Fehlen von TGF- β führt zu massiven Störungen der Infektabwehr, welche zum Tode führt (Kulkarni et al., 1993, Shull et al., 1992). Die TGF- β defizienten Tiere zeigten zusätzlich eine starke
20 Autoimmunreaktivität (Letterio et al., 1996) über Beeinflussung von MHC class II Antigen-Expression (Geiser et al., 1993).

Da an Zelloberflächen immobilisiertes TSP-1 TGF- β aktivieren kann, liegt nahe, dass TSP-1 über TGF- β an den beschriebenen Prozessen der
25 Infektabwehr und Autoimmunreaktivität beteiligt ist (Crawford et al., 1998). Immobilisiertes TSP-1 reguliert zusammen mit TGF- β die Proliferation von „Natural Killer“-Zellen (NK-Zellen) (Pierson et al., 1996). Die TSP-1 defizienten Tiere zeigen, wenn auch in schwächerer Ausprägung, entsprechende Immundefekte. Da das in dieser Erfindung
30 erstmals beschriebene aktivierte Antithrombin, welches TSP-1 bindet, TSP an Zelloberflächen immobilisieren kann, liegt nahe, dass IDAAT indirekt die Aktivierung von TGF- β beeinflusst.

- 8 -

TSP-1 moduliert aber auch über andere Mechanismen immunologische Abwehr-relevante Prozesse. So haften eine große Anzahl von Mikroorganismen, wie z.B. coagulase-negative Staphylococci (Li et al., 2000), Enterococci und Porphyromonas gingivalis fimbriae (Nakamura et al., 1999) an immobilisiertes TSP-1.

5

Mit dem Erreger der Malaria tropica befallene Erythrozyten haften an immobilisiertes TSP-1 (Roberts et al., 1985) und an den TSP-1 Rezeptor CD36.

10

Der Parasit selbst hat ein Membranprotein, welches TSP-1 homologe Bereiche enthält. Über dieses in die Erythrozytenmembran transportierte Protein TRAP (Thrombospondin-related-anonymous (adhesive)-protein) kann der Parasit das Anheften der befallenen Erythrozyten an die Gefäßwand vermitteln (Wegelnik et al., 1999, Kappe et al., 1999).

15

Auch andere Krankheitserreger, wie z.B. Cryptosporidium parvum oder Eimeria tenella, haben TSP oder TSP-Rezeptor homologe Domänen, die sie für die Zelladhäsion nutzen (Sulaiman et al., 1999).

20

Das HIV-1-Virus benutzt in seinem Oberflächenprotein GP 120 eine CD36 (TSP-Rezeptor)-Domäne, mit der der HIV Virus sowohl an TSP, als auch an CD4 auf den Wirtszellen binden kann (Crombie et al., 1998).

Gereinigtes TSP-1 kann daher HIV-1 Infektionen inhibieren (Crombie et al., 1998).

25

Mehrere Complement-Proteine, C9, C8 alpha und C8 beta, haben Module mit hoher Homologie zu einem der „Repeat“-Module von Thrombospondin (Patthy, 1988). Weitere TSP-homologe Domänen haben auch Antistasin, Properdin und F-spondin. F-spondin ist, wie Thrombospondin selbst, eine effektive Substanz zur Verbesserung von Läsionen des Nervensystems (US 5750502).

30

Indem es gleichzeitig an apoptotische neutrophile Granulozyten (PMNL) und an Makrophagen bindet, kann TSP die Phagozytose von apoptotischen PMNL medieren. Für diesen Prozess ist die gleichzeitige Interaktion von TSP mit seinen Rezeptoren $\alpha_v\beta_3$ -Integrin, CD36 und CD47 verantwortlich (Savill et al., 1992). Die Phagozytose von apoptotischen PMNL reguliert Entzündungsreaktionen und verhindert ein unkontrolliertes Überschießen. Im Gegensatz zur Phagozytose von nekrotischen PMNL oder zuweit im Abbau fortgeschrittenen PMNL erfolgt die TSP-1 vermittelte Phagozytose von apoptotischen PMNL ohne Freisetzung von proinflammatorischen Mediatoren (Stern et al., 1996).

Die rechtzeitige TSP-medierte Phagozytose verhindert so eine überschießende Entzündungsreaktion. Zusätzlich wird aktiv von Makrophagen, welche apoptotische PMNL aufgenommen haben, die Produktion von proinflammatorischen Cytokinen inhibiert (Fadok et al., 1998). Die Quervernetzung vom TSP-Rezeptor CD47 auf Monozyten durch TSP-1, wie durch die hier beschriebene Erfindung erreicht, führt zusätzlich zu einer Inhibierung der Freisetzung von aktivem Interleukin 12 (IL-12) (Armant et al., 1999, Demeure et al., 2000). Interleukin-12 ist ein wichtiger Mediator der Sepsis (Steinhauser et al., 1999).

Die Immobilisierung von TSP-1 an apoptotische PMNL und an Monozyten ist daher ein guter Weg, medikamentös Zustände mit persistierenden, chronischen Entzündungen positiv zu beeinflussen. Zu diesen Erkrankungen gehören auch alle, bei denen eine überschießende Entzündungsreaktion einen Teil der Krankheit selbst darstellt, wie die verschiedenen Reperfusionsschäden, Abstoßungsreaktionen bei Organtransplantationen und Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises.

Nicht nur apoptische neutrophile Granulozyten werden TSP vermittelt phagozytiert, sondern auch senescente Eosinophile (Stern et al., 1996). Dies zeigt, dass TSP-Immobilisierung an Zelloberfläche, wie durch die hier

- 10 -

beschriebene Erfindung erreicht, auch ein Weg ist, die unerwünschte, proinflammatorische Antwort bei Erkrankungen, die Eosinophil-mediiert sind, wie Allergie, Asthma, parasitäre Erkrankungen, bestimmte Tumore und Bindegewebserkrankungen, medikamentös zu bekämpfen. So wird
5 verhindert, dass hoch toxische Substanzen von den Eosinophilen freigesetzt werden und das Gewebe schädigen, bzw. zerstören.

TSP bindet Chemokine, wie RANTES, und verhindert so die Bindung des Chemokins an seinen Rezeptor (Barnes et al., 1998). Auch über diesen
10 Weg moduliert TSP Entzündungsreaktionen und Immunabwehr.

Ein Medikament, welches TSP in seiner Funktion beeinflusst, indem es die Konformation ändert, oder die Immobilisation an Zelloberflächen von immunkompetenten Zellen fördert, limitiert die unerwünschte
15 Immunresponse bei Krankheiten, wie, aber nicht beschränkt auf, Rheumatische Arthritis, Goodpasture Syndrom, Insulin-abhängiger Diabetes, Pemphigus, Pemphigoid, primäre biliäre Cirrhose, Colitis ulcera, Lupus erythematosus, Graft-versus-Host Erkrankung, Sepsis.

20 Immobilisierung von TSP an Zelloberflächen führt zur Quervernetzung seines Rezeptors CD47. Diese Quervernetzung von CD47 auf chronisch lymphatischen Leukämiezellen (CLL-Zellen) verursacht spezifisch den Zelltod dieser Tumorzellen (Mateo et al., 1999).

25 Eine Substanz, die die Bindung von TSP an Leukämiezellen bewirkt, wäre somit ein wirkungsvolles Medikament zur Bekämpfung der CLL, einer tödlichen Erkrankung, gegen die es noch kein spezifisches wirksames Medikament gibt.

30 Thrombospondin inhibiert nicht nur über seine Wirkung auf TGF- β die Neoangiogenese, sondern auch über Immobilisierung und Bindung an und Aktivierung von CD36.

Behandlung von Tumoren in Mäusen mit TSP-1 führt zu Inhibition der Neoangiogenese und zur Apoptose von Endothelzellen (Jiminez et al., 2000).

5 Inhibierung der Tumorangiogenese ist ein guter Weg, medikamentös das Wachstum von Tumoren zu begrenzen (Roberts et al., 1996). Eine Substanz, die die Bindung von TSP an Endothelzellen in Tumoren vermittelt, gewinnt damit antiangiogenetische und somit Krebsbekämpfende Eigenschaften.

10

Neoangiogenese ist auch eine Ursache für Erblindung, z.B. bedingt durch Diabetes mellitus (Kaplan et al., 1999, Shafiee et al., 2000), altersbedingte Macular Degeneration oder Frühreife von Säuglingen. Auch zur Bekämpfung dieser Neoangiogenese wäre eine Substanz, welche die
15 Bindung von TSP an Endothelzellen vermittelt, medikamentös einsetzbar.

20

Nach einer Verletzung steigen die Konzentrationen an TSP im Gewebe rund um die verletzte Region signifikant an. Nach einer Balloon-Katheterisierung z.B. kann schon 1 Stunde nach Verletzung auf den Oberflächen der Zellen TSP detektiert werden (Watkins et al., 1990, Munjal et al., 1990). Das TSP auf der Zelloberfläche nimmt noch in den darauffolgenden Tagen zu und wird dann zunehmend auch in der Matrix angereichert.

25

Mit zunehmender Wundheilung verschwindet TSP wieder von den Zellmembranen des verletzten Gewebes.

30

Eine der Aufgaben, die TSP in der Wunde wahrnimmt, ist die Verbesserung der Wundheilung (US Patent 5, 155, 038). Eine Substanz, die TSP-1 in der Wunde immobilisiert, müsste die Wundheilung verbessern.

TSP in der Wunde wird von den Gewebezellen exprimiert aber auch von Blutplättchen, während deren Aktivierung freigesetzt.

- 12 -

Etwa 1% des gesamten Plättchenproteins und ca. $\frac{1}{4}$ des Proteingehalts der Plättchen α -Granula ist Thrombospondin-1 (Kehrel, et al., 1996). Freigesetztes Thrombospondin fördert die Kollagen-induzierte Plättchenaggregation (Kehrel, et al., 1988). Im C-Terminus enthält TSP eine
5 Sequenz, RFYVVMWK, welche über CD47 Plättchen aktiviert (Chung et al., 1999 und 1997). Lösliches TSP, dem Blut, Plättchensuspension oder Plättchenreiches-Plasma zugesetzt wird, löst jedoch allein keine Aggregation aus.

10 Während Plättchen in Suspension TSP nur in seiner Ca^{2+} -Form binden können, haften Plättchen sowohl an die „high „ als auch „low“- Ca^{2+} -Form des an Matrix immobilisierten Thrombospondin.

Die Aufgabe der vorliegenden Erfindung war es daher, ein Arzneimittel
15 bereitzustellen, welches die zuvor angesprochenen Funktionen ausüben und damit die erwarteten Wirkungen erfüllen kann.

Gelöst wird diese Aufgabe durch ein Arzneimittel, enthaltend aktiviertes Antithrombin III (IDAAT), IDAAT-Peptide, -Analoga oder -Mimetika.

20 Im Rahmen der vorliegenden Erfindung ist, wie oben bereits ausgeführt, festgestellt worden, dass aktiviertes IDAAT über seine nun neu im Rahmen der vorliegenden Erfindung festgestellten Eigenschaften und Funktionen eine Vielzahl von Reaktionen im Körper auslöst oder vermittelt, welche sich
25 zur Behandlung von Krankheiten ausnutzen lassen. Diese Funktionen und Eigenschaften werden im Folgenden weiter erläutert werden, ebenso wie die damit zu behandelnden Krankheiten oder Krankheitszustände. Auch eine Prophylaxe kann in vielen Fällen mit Hilfe von IDAAT stattfinden.

30 Im Rahmen der vorliegenden Erfindung kann das Arzneimittel sowohl das vollständige IDAAT enthalten, welches beispielsweise gemäß dem in den Beispielen beschriebenen Verfahren hergestellt werden kann. Theoretisch

- 13 -

kann auch aus dem Körper nach Abwehrreaktion gebildetes IDAAT isoliert werden. Des Weiteren ist es denkbar, IDAAT-Peptide zu verwenden, welche die Interaktion mit Proteinen wie Thrombospondin, Vitronectin, CD36, oxLDL, $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Integrin, $\alpha_v\beta_3$ -Integrin und anderen vermitteln.

5 Derartige geeignete Peptide können leicht durch vorbereitende Versuche aufgefunden werden, indem beispielsweise ihre Interaktion mit einem der oben genannten Proteine getestet wird.

Auch Analoga von IDAAT sind im Rahmen der vorliegenden Erfindung dann

10 geeignet, wenn sie ebenfalls die Interaktion mit den genannten Proteinen vermitteln. Schließlich ist es auch möglich, IDAAT-Mimetika einzusetzen, welche aufgrund ihrer Struktur oder/und funktioneller Gruppen gleiche Wirkungen und Interaktionen wie IDAAT zeigen können.

15 Im Rahmen der vorliegenden Erfindung ist es bevorzugt, rekombinantes IDAAT zu verwenden, wozu rekombinant hergestelltes Antithrombin III in geeigneter Weise behandelt wird, um darauf aktiviertes Antithrombin III zu erhalten (siehe Beispiele sowie diese Beschreibung). Auch Peptide oder Analoga von IDAAT werden vorzugsweise in rekombinanter Form

20 synthetisiert und dann aktiviert.

Ein erfindungsgemäßes Arzneimittel kann selbstverständlich weitere pharmazeutisch annehmbare Hilfs- oder/und Trägersubstanzen enthalten, wobei das Arzneimittel zur lokalen, intradermalen, oberflächlichen,

25 intraperitonealen, intravenösen oder intramuskulären oder oralen Verabreichung formuliert wird oder seine Verabreichung über Vesikel ermöglicht wird. Das erfindungsgemäße Arzneimittel enthält daher vorzugsweise solche Hilfs- und Trägersubstanzen, die die jeweilige bevorzugte Applikationsart ermöglicht.

30

Das erfindungsgemäße Arzneimittel kann neben dem IDAAT oder Teilen oder Analoga oder Mimetika davon weitere Substanzen enthalten, wie

beispielsweise Antibiotika, Immunsuppressiva etc. Je nach zu behandelnder Krankheit kann es von Vorteil sein, unterstützend mit bekannten Arzneimitteln zu behandeln. Eine entsprechende Kombination dieses Arzneimittels mit IDAAT oder seinen Analoga ist daher gegebenenfalls eine bevorzugte Ausführungsform der vorliegenden Erfindung.

Durch die im Rahmen der vorliegenden Erfindung festgestellten Vorgänge im Körper, welche durch aktiviertes Antithrombin III bewirkt werden, kann das erfindungsgemäße Arzneimittel für eine Vielzahl von Indikationen angewandt werden. Im Folgenden sollen Beispiele für neue Funktionen von IDAAT aufgeführt werden, die Antithrombin-Präparate und insbesondere handelsübliche Antithrombin-Präparate nicht aufweisen:

- 1) IDAAT vermittelt spezifisch und dosisabhängig die Bindung von TSP-1 an Monozyten, monozytären Zelllinien und monozytären Zellen, wie Makrophagen.

Während ohne Zusatz von gereinigtem TSP-1 und ohne Zusatz von IDAAT nur ~ 1% der elutrierten humanen Monozyten durch einen Antikörper (Klon P10), der TSP-1 auf der Zelloberfläche erkennt, im Durchflußzytometer detektiert werden konnten, steigt die Anzahl durch Zusatz von 10 µg/ml gereinigtem TSP-1 auf ca. 5%.

Zusatz von IDAAT (ohne Zusatz von gereinigtem TSP-1) vermittelt die TSP-1 Bindung von endogenem TSP an die Monozyten. Ca. 18% der Monozyten wurden TSP-1 positiv.

Durch gleichzeitige Gabe von TSP und IDAAT wurden nahezu alle (> 90%) der verwendeten peripheren Blutmonozyten stark positiv für TSP (siehe Abbildung 1).

- 2) IDAAT vermittelt die TSP Anbindung an apoptotische PMNL

- 15 -

Durch Alterung (24 h Inkubation in Zellkulturmedium im Inkubator gemäß Savill 1992) apoptotisch gemachte PMNL binden TSP. Dieser Vorgang wird durch Zusatz von IDAAT dosisabhängig, spezifisch gesteigert (siehe Abbildung 2). Gleichzeitige Zugabe von gereinigtem TSP + IDAAT steigert
5 die Wirkung weiter.

3) IDAAT quervernetzt über TSP apoptotische PMNL mit Monozyten. Zusatz von TSP und IDAAT führt dosisabhängig zur Assoziation von apoptotischen PMNL mit Monozyten (siehe Abbildung 3).

10

4) IDAAT fördert dosisabhängig die Transmigration von Monozyten durch Endothel

Transmigrationsexperimente wurden, wie bei Kielbassa et al., 1998
15 beschrieben, durchgeführt. Die Zugabe von IDAAT zum Kulturmedium der Monozyten während eines Transmigrationsversuchs fördert dosisabhängig die Transmigration von Monozyten durch Endothel um das 2-3fache (siehe Abbildung 4).

Auch der Zusatz von gereinigtem TSP (25 µg/ml) fördert die Transmigration der Monozyten. Zusatz von TSP + IDAAT führt bei geringen
20 Konzentrationen von TSP und IDAAT zu einer Steigerung der Transmigration, die größer ist, als durch Zusatz der Einzelsubstanzen alleine.

25 5) IDAAT aktiviert Monozyten

IDAAT induziert dosisabhängig Ca^{2+} -Flux in Monozyten. Die Ca^{2+} -Messung wurden nach Sorrani et al., 1993 durchgeführt. Elutrierte Monozyten ($5 \times 10^6/\text{ml}$) wurden bei Raumtemperatur mit Hepes-Tyrode Puffer pH 7.4
30 gewaschen und anschließend 15 Min mit 1 µM Fura2/AM bei 37 °C markiert, zweimal in Hepes-Tyrode Puffer ohne Ca^{2+} gewaschen und dann in Hepes-Tyrode mit 1 mM Ca^{2+} aufgenommen.

- 16 -

Ca²⁺-Signale induziert durch IDAAT, TSP-Peptid RFYVVMWK, und als positiv oder negativ Kontrollen wirksame Substanzen, wurden fluorimetrisch im Hitachi F-2000 bestimmt.

IDAAT (100 µg/ml) aktiviert die Monozyten und ruft ein deutliches Ca²⁺-Signal hervor (siehe Abbildung 5).

6) IDAAT vermittelt die Anbindung von TSP-1 an T-Zellen und an dendritische Zellen

IDAAT vermittelt die Anbindung von T-Zellen sezerniertem TSP und von exogen zugesetztem TSP an humane T-Zellen (hier als Beispiel Jurkatzellen) (siehe Abbildung 6).

7) IDAAT verstärkt dosisabhängig die aktivierende Wirkung von fMLF auf den oxidativen Burst von PMNL

Die Induktion des oxidativen Burst wurde im wesentlichen gemäß Arbeitsanleitung des Herstellers mit dem Phagotest/Burst-Test der Firma Orpegen (Heidelberg) am Durchflußzytometer durchgeführt, jedoch zuerst die PMNL mit dem Substrat DHR123 inkubiert und anschließend die PMNL aktiviert.

IDAAT steigert dabei dosisabhängig die aktivierende Wirkung von fLMF auf den oxidativen Burst. IDAAT und fLMF haben beide eine additive Wirkung. IDAAT steigert nicht nur die aktivierende Wirkung von anderen Agonisten auf den oxidativen Burst der PMNL, sondern löst ihn als selbständiger, unabhängiger Agonist auch aus (siehe Abbildung 7). Somit ist IDAAT ein wertvolles Werkzeug zur Steigerung der Infektabwehr.

8) IDAAT inhibiert spezifisch und dosisabhängig die Freisetzung von aktivem Interleukin 12 (IL-12) durch aktivierte Monozyten

Aktives IL-12 spielt eine negative Schlüsselrolle bei Entzündungsreaktionen und Sepsis. Mit Interferon γ (INF γ) und *Staphylococcus aureus* aktivierte Monozyten produzieren IL-12 und setzen es frei.

Diese Reaktion konnte durch IDAAT dosisabhängig gehemmt werden. Die
5 Konzentration von aktivem IL-12 im Kulturmedium der Monozyten wurde mittels ELISA bestimmt.

Durch Inkubation der Monozyten mit IDAAT wurde die IL-12 Freisetzung vollständig inhibiert (siehe Abbildung 8).

Im Gegensatz zur Sekretion von IL-12 wird die Sekretion von IL-10,
10 welches in der Sepsis schützende Wirkung hat, durch IDAAT dosisabhängig gesteigert (siehe Abbildung 9). Dies zeigt die Infekt-Abwehr modulierende Wirkung von IDAAT und legt die Nützlichkeit von IDAAT bei septischen Reaktionen nahe. Die Freisetzung eines weiteren „schädlichen“ Interleukins, des TNF α , wird durch IDAAT inhibiert (Abbildung 10).

15

9) IDAAT inhibiert Entzündungsreaktionen in vivo

Im Ohr von Balb-C-Mäusen wurde durch lokale Injektion von anti-BSA zum Zeitpunkt 0 und gleichzeitiger Injektion von FITC-gekoppeltem BSA ins
20 Peritoneum eine Arthus Reaktion ausgelöst. Kontrolltieren (Negativkontrollen) wurde nur FITC (ohne BSA) ins Peritoneum injiziert. Nach ca. 6 Stunden zeigte sich eine deutlich ausgeprägte Entzündungsreaktion mit Anschwellung des Ohres (Oedem), FITC-Einlagerung, Einwanderung von PMNL und petechialen Einblutungen ins
25 Gewebe bei den mit anti BSA- und BSA-FITC behandelten Tieren.

8 Mäusen wurde zusätzlich zum Zeitpunkt 0 und nach 0 + 3 Stunden je 50 μ g IDAAT in Puffer intraperitoneal injiziert.

6 Kontrollmäusen erhielten zum Zeitpunkt 0 und 0 + 3 Stunden statt IDAAT nur den Puffer, 50 mM Tris/HCl-Puffer mit 150 mM NaCl pH 7.4, in
30 dem IDAAT üblicherweise gelöst wird.

Die Arthus Reaktion wurde durch IDAAT fast vollständig verhindert. Mit IDAAT behandelte Mäuse zeigten signifikant geringere FITC-Einlagerungen,

- 18 -

signifikant geringere Ohrdicken und fast keine Petechien im Vergleich zu „Puffer“ behandelten Tieren (siehe Abbildung 1.1):

- 10) IDAAT inhibiert die HIV-1 Infektion von monozytären Zellen aus periphärem Blut (PBMC)

PHA-aktivierte PBMC wurden zusammen mit negativem humanen Serum 1:100 (Negativ-Kontrolle), mit neutralisierendem V3loop spezifischen Antikörper (Positivkontrolle), mit IDAAT (150 µg/ml) und einem CCR5-tropen HIV-1 Primärisolat (903) aus einem Patienten inkubiert und nach fünf Tagen die Virus-Produktion mittels p24-ELISA untersucht.

Dazu wurden frisch PHA-aktivierte PBMC in RPMI 1640 Medium + 20% FKS + 100 U/ml IL-2 in einer Zellkonzentration von 2×10^6 Zellen/ml aufgenommen und mit jeweils 200.000 Zellen/well/100 µl auf einer 96well-Flachbodenplatte verteilt.

Auf Inhibition zu testende Substanzen,

Positivkontrolle: neutralisierender humaner anti V3loop Antikörper 1:100,

Negativkontrolle: neg. humanes Serum 1:100 und

Verum: IDAAT (150 µg/ml),

wurden in RPMI-Medium den Zellen zugesetzt und für 30 Minuten bei 37 °C/5% CO₂ inkubiert. Anschließend wurde das HIV-1 Virus zu den Ansätzen gegeben: jeweils 10 µl/well aus HIV-1 Primärisolat 903-Überstand (CCR5-trop) mit 20000 TCID₅₀ (50% tissue culture infective dose)/ml

≅ 1000 TCID₅₀/ml im well.

Diese Ansätze wurden über Nacht bei 37°C/5%CO₂ inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen dreimal mit RPMI 1640 gewaschen und neues Kulturmedium zugegeben. Am 5. Tag nach der Infektion wurden die p24-ELISA-Untersuchungen durchgeführt.

P24-ELISA:

- 19 -

Die verwendeten α -p24-Antikörper (11-G7 [Niedrig, Berlin] und D7320 [Biochrom]) erkennen das p24-Protein der verwendeten Primärisolatvariante 903. Maxi-Sorb-ELISA-Platten (Nunc) wurden mit diesen Antikörpern über Nacht beschichtet. Der Virus-Überstand aus dem Inhibitionsversuch wurde mit 1% Triton X-100 inaktiviert. Der inaktivierte Virus-Überstand und der alkalische-Phosphatase-konjugierte- Detektions-Antikörper (BC1071-AP [Aalto]) wurden, nach Waschen der beschichteten Wells mit PBS, gemeinsam in die Wells überführt und dort für 5 Stunden bei 37°C inkubiert. Die Wells wurden wieder mit PBS gewaschen, gelöstes Substrat für die alkalische Phosphatase p-Nitrophenyl-Phosphat [Sigma] in die Wells gegeben und die Farbentwicklung nach 20 Minuten bei 405 nm im ELISA-Photometer gemessen. Die Parallelwerte in dem verwendeten p24-ELISA schwankten bis zu 0.02 optische Dichte (oD) Einheiten um einen gemeinsamen Mittelwert.

Während die oD 405 nm für die Negativkontrolle \cong keine Inhibition bei 0.8 lag, reduzierte der neutralisierende Antikörper (Positivkontrolle) die oD auf 0.12. 150 μ g/ml IDAAT reduzierte die oD auf 0.10. Durch Zugabe von IDAAT konnte die HIV-1 Infektion der PBMCs effektiv gehemmt werden.

11) IDAAT vermittelt die *S. aureus*-Bindung an zur Phagozytose und Bakterienabwehr fähige Zellen (Blutplättchen, Monozyten, PMNL)

Thrombozyten wurden mit einem Thrombozytenspezifischen Phycoerythrin konjugierten anti GPIX Antikörper (Klon Beb 1) markiert. Bakterien (verschiedene *S.aureus* Stämme) wurden mit Tris-gepufferte Salzlösungen (TBS) auf eine Zahl von 250.000 Keime/ μ l eingestellt und mittels RNA-Farbstoff Syto13 [MoBiTec, Göttingen] in einer Konzentration von 2 μ M markiert. Markierte Bakterien und markierte Thrombozyten wurden im Verhältnis von 10:1 für 10 Minuten koinkubiert.

Zellpopulationen wurden im Durchflußzytometer analysiert. Für beide Fluorochrome positive Zellen wurden als Assoziante gewertet (siehe

- 20 -

Abbildung 12 a). Thrombin-Stimulierung und Freisetzung von TSP aus den α -Granula der Plättchen erhöhte den prozentualen Anteil der bakterientragenden Plättchen im Verhältnis zur Thrombozytengesamtzahl um das 2.5fache. Diese Steigerung war nicht zu beobachten bei
5 Verwendung von Plättchen von 2 Patienten mit Gray-Platelet-Syndrom, deren Plättchen das TSP fehlt (siehe Abbildung 12 b).

IDAAT förderte dosisabhängig die Bindung von *S. aureus* an Thrombozyten (siehe Abbildung 12 c).

Da Thrombozyten ein sogenanntes „microbicidal protein“ haben, welches
10 Bakterien vernichten kann, ist auch diese Funktion von IDAAT als wertvoller Beitrag zur Infektabwehr zu werten.

12) IDAAT verbessert die Blutstillung

15 a) IDAAT vermittelt die Bindung von Thrombospondin an Thrombozyten
Gereinigtes TSP-1 wurde mit FITC markiert und in einer Konzentration von 50 $\mu\text{g/ml}$ gefiltrierten Thrombozyten (50.000/ μl) in Hepes-Tyrode Puffer mit BSA zugesetzt. IDAAT wurde in steigenden Konzentrationen zugesetzt und 60 Minuten zusammen mit den Plättchen bei Raumtemperatur
20 inkubiert. Gebundenes TSP-FITC auf der Thrombozytenoberfläche wurde im Durchflußzytometer quantifiziert. IDAAT vermittelte die Bindung von Thrombospondin an Thrombozyten (siehe Abbildung 13).

b) IDAAT fördert die Fibrinogen-Bindung an Thrombozyten
25 Gelfiltrierten Plättchen 50.000/ μl in Hepes- Tyrode BSA Puffer oder mit PPACK antikoaguliertes Plättchenreiches Plasma (50.000/ μl) wurde FITC-konjugiertes Fibrinogen (150 $\mu\text{g/ml}$) zugesetzt. Die Plättchensuspensionen wurden mit meth. Kollagen Typ I, wie in Kehrel et al., 1998 beschrieben, aktiviert. Ein Teil der Proben wurde mit IDAAT in aufsteigenden
30 Konzentrationen versetzt. Nach Inkubation für 30 Minuten bei Raumtemperatur wurden die Plättchen fixiert, gewaschen und die Fibrinogenanbindung im Durchflußzytometer quantitativ bestimmt. IDAAT

verstärkt die durch Kollagenaktivierung induzierte Fibrinogenanbindung an Plättchen (siehe Abbildung 14a).

Zusatz von gereinigtem Thrombospondin + IDAAT in steigenden Konzentrationen hatte selbst eine Plättchen-aktivierende Eigenschaft und führte zu Fibrinogenbindung an die Plättchenmembran (siehe Abbildung 14b).

c) IDAAT fördert die Adhäsion von Thrombozyten an Adhäsionsproteine wie Thrombospondin, Fibrinogen, Fibronectin, Vitronectin und Kollagen.

Die Adhäsion der Thrombozyten wurde nach Santoro et al., 1994 durchgeführt. Mikrotiterplatten (96 well) wurden mit Adhäsionsproteinen in einer Konzentration von 25 µg/ml über Nacht bei 4°C „gecoatet“ und die Platten mit BSA geblockt. 100 µl gelfiltrierten Plättchen oder mit Hirudin antikoagulierte Plättchenreiches Plasma (300.000 Plt/µl) wurden bei Raumtemperatur für 1 Stunde in einer feuchten Kammer in den Wells inkubiert. Nicht adhärenzte Thrombozyten wurden gründlich ausgewaschen. Die Anzahl der adhärenzten Plättchen wurde durch Lyse der Plättchen mit Triton X-100 und Nachweis des lysosomalen Enzyms Hexosaminidase bestimmt.

Zur Kalibrierung des Adhäsions-Assays wurde auf der Mikrotiterplatte ein Eichreihe mit bekannter Anzahl ansteigender Plättchen gegeben und die Extinktion des umgesetzten Substrates P-Nitrophényl-N-Acetyl-β -D-Glucosaminid im Verhältnis zur Plättchenzahl bestimmt. IDAAT steigerte dosisabhängig die Adhäsion von Thrombozyten an die getesteten Adhäsionsproteine (siehe Abbildung 15a). Handelsübliche ATIII-Präparate zeigten diese Wirkung nicht (siehe Abbildung 15b).

Die Steigerung der Thrombozytenadhäsion durch IDAAT ist eine Integrin ($\alpha_v\beta_3$, $\alpha_{IIb}\beta_3$)-und CD36-vermittelte Reaktion (siehe Abbildung 16 und 17).

- 22 -

Die IDAAT vermittelte Thrombozytenadhäsion ist nicht Thrombin-vermittelt und findet daher auch im mit Hirudin antikoaguliertem Blut statt (siehe Abbildung 18).

Heparansulfat (0-10 $\mu\text{g/ml}$) und Sulfatid (0-20 $\mu\text{g/ml}$) hemmen die durch
5 IDAAT vermittelte Adhäsion nicht.

Die IDAAT vermittelte Thrombozytenadhäsion ist abhängig von zweiwertigen Ionen. 5 mM EDTA hemmen diese Adhäsion an Thrombospondin und an Kollagen vollständig (siehe Abbildung 19). 20 μM Mg^{2+} , 1 mM Ca^{2+} oder andere zweiwertige Ionen steigern die IDAAT
10 vermittelte Thrombozytenadhäsion an Kollagen.

Lösliches TSP-1 hemmt die IDAAT vermittelte Adhäsion von Thrombozyten an Kollagen oder immobilisiertes TSP-1 (siehe Abbildung 20).

Zusatz von Monozyten zu den Thrombozyten steigert die Adhäsion der Thrombozyten an Thrombospondin und an Kollagen, während der Zusatz
15 von Erythrozyten die Adhäsion von Thrombozyten an TSP und an Kollagen hemmt (siehe Abbildung 21).

Die IDAAT vermittelte Adhäsion von Thrombozyten an Thrombospondin kann durch die PI-3-Kinase-Hemmer Wortmannin und LY294002 vollständig gehemmt werden (siehe Abbildung 22).

20

d) IDAAT vermittelt die TSP-medierte Aggregation von Thrombozyten Gelfiltrierte Plättchen (200.000/ μl) in Hepes- Tyrode Puffer pH7.4 mit Zusatz von Fibrinogen (100 $\mu\text{g/ml}$) wurden im Aggregometer nach Born untersucht. Während gereinigtes Thrombospondin (25 $\mu\text{g/ml}$) allein keine
25 Aggregation auslöste, führte der Zusatz von IDAAT dosisabhängig zur Aggregation, die durch gleichzeitige Gabe von TSP und IDAAT deutlich verstärkt wurde (siehe Abbildung 23).

e) IDAAT vermittelt die Mikropartikelbildung von Thrombozyten
30 Gelfiltrierte Plättchen wurden mit dem TSP-1 Peptid RFYVVMWK (40 μM) aktiviert. Die Mikropartikelbildung wurde nach Markierung mit einem Thrombozyten-spezifischen anti GPIX Phycoerytrin konjugierten Antikörper

nach Dörmann et al., 1999, im Durchflußzytometer gemessen. Zusatz von IDAAT führte dosisabhängig zur Mikropartikelbildung der aktivierten Plättchen (siehe Abbildung 24).

5 f) IDAAT vermittelt die Assoziation von Thrombozyten und Leukozyten
Zur durchflußzytometrischen Detektion der Plättchen-Leukozyten-Assoziate
wurden die Thrombozyten mit einem FITC-konjugierten monoklonalen
Antikörper gegen das Plättchen-spezifische Antigen GPIX (Klon Beb 1) und
10 die Monozyten mit einem PE-konjugierten monoklonalen Antikörper gegen
CD14 (Klon: MØP9) in sättigenden Konzentrationen nach Zellaktivierung
und Zellfixierung markiert. Die Quantifizierung der Assoziate erfolgte durch
Detektion von CD14- und GPIX-positiven Partikeln. Der prozentuale Anteil
von Leukozyten, die mit Plättchen assoziiert vorlagen, wurde zur
15 Leukozytengesamtpopulation ins Verhältnis gesetzt. Thrombozyten
(25.000/ μ l) und Monozyten (3000/ μ l) wurden miteinander für 30 Minuten
inkubiert. Die Thrombozyten wurden zuvor für 30 Minuten mit IDAAT
vorinkubiert und anschließend gewaschen. IDAAT steigerte die
Assoziationsrate von 11.7% auf 17,3% (5 μ g/ml IDAAT) bzw. 20.5% (10
mg/ml IDAAT).

20

13) IDAAT vermittelt/verstärkt die TSP-Anbindung an Endothelzellen

Humane mikrovaskuläre Endothelzellen (HMEC-1) (3000/ μ l) in RPMI 1640
Medium wurden für 30 Minuten bei Raumtemperatur mit IDAAT oder TSP-1
25 (25 μ g/ml) plus IDAAT inkubiert. Die Endothelzellen wurden fixiert,
gewaschen und TSP mit einem monoklonalen PE-konjugierten anti TSP-
Antikörper (Klon P10) im Durchflußzytometer detektiert. Der Median der
Fluoreszenz, der die Anbindung des anti TSP-Antikörpers widerspiegelt,
stieg von 79 (ohne IDAAT) auf 138 (5 μ g/ml IDAAT). Zusatz von
30 exogenem TSP-1 (25 μ g/ml) steigerte den Median der Fluoreszenz auf 268
bei gleichzeitigem IDAAT-Zusatz (5 μ g/ml) (siehe Abbildung 25).

- 24 -

14) IDAAT vermittelt die Bindung von Thrombozyten an mit Vitronectin ummantelte Latex-„Beads“

5 Latex Beads (3.2 μm) wurden über Nacht bei 4°C mit aktivem Vitronectin (25 $\mu\text{g/ml}$) ummantelt und dann gewaschen. Vitronectin-tragende Beads wurden mit gelfiltrierten Thrombozyten (25.000/ μl) in Abwesenheit und Gegenwart von steigenden Konzentrationen an IDAAT für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert.

10 Thrombozyten wurden mit anti GPIX (Klon Beb1) markiert und Assoziat aus Vitronectin ummantelten Beads mit Thrombozyten im Durchflußzytometer quantifiziert. IDAAT steigerte dosisabhängig die Bindung von Thrombozyten an die Vitronectin ummantelten Beads (siehe Abbildung 26).

15 15) IDAAT besteht aus polymerisiertem ATIII

IDAAT, IDAAT-TSP-1-Aggregate, handelsübliches ATIII und handelsübliches ATIII mit TSP-1-Zusatz wurden elektronenmikroskopisch mittels „Rotary-Shadowing“-Verfahren nach Jander et al (1984) dargestellt. IDAAT
20 bestand aus polymeren ATIII-Molekülen, während handelsübliche ATIII-Präparate eine monomere Struktur aufwiesen (siehe Abbildungen 27 a und b). Zusatz von TSP-1 zu IDAAT führte zur Bildung von großen IDAAT-TSP-1-Komplexen, während dies nicht mit handelsüblichem ATIII beobachtet wurde (siehe Abbildungen 27 c und d).

25

16) IDAAT erhält neue proteinbindende Eigenschaften

IDAAT bindet direkt an Proteine, an die nichtaktiviertes Antithrombin nicht binden kann, wie CD4 (z.B. der T-Zellen) (Abbildung 28), GP120 des HI-
30 Virus (Abbildung 29), Thrombospondin (Abbildung 30), aktives Vitronectin (Abbildung 31), CD36, $\alpha_v\beta_3$ -Integrin. Die Bindung von IDAAT an diese Proteine wurde mittels ELISA an gereinigten oder rekombinanten Proteinen

durchgeführt. Die Reinigung von TSP-1, aktivem Vitronectin, $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Integrin und CD36 erfolgte wie bei Kehrel et al. 1993, Yatohgo et al. 1988 und Kronenberg, Grahl und Kehrel 1998, beschrieben.

- 5 Die Herstellung von IDAAT kann im Rahmen der vorliegenden Erfindung beispielsweise wie folgt erfolgen:

Handelsübliches Antithrombin III wird mit NaOCl oxidiert und über eine Sephadex-Säule gegeben (Beispiel 1). Vor der Oxidation kann Antithrombin III vorzugsweise noch mit neutrophiler Granulozyten-Elastase inkubiert
10 werden (siehe Beispiel 2). Vor der Oxidation kann Antithrombin III auch mit Matrixmetalloproteinase gespalten werden (siehe Beispiel 3). Antithrombin III kann auch durch Reaktion mit Defensin 2 aktiviert werden (siehe Beispiel 4).

- 15 Dieses Verfahren zur Herstellung von IDAAT ist ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung.

Wiederum ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist die Verwendung eines erfindungsgemäßen Arzneimittels, wobei die im
20 Folgenden genannten Krankheiten oder Krankheitszustände bei Menschen oder Tieren behandelt werden können. Das erfindungsgemäße Arzneimittel kann dabei sowohl zur Prophylaxe als auch als Heilmittel eingesetzt werden. Indikationen sind akute Infektionen, insbesondere Infektionen mit Erregern, die direkt oder indirekt an IDAAT oder einen Interaktionspartner
25 binden, ganz besonders: die Gruppe der HI-Viren, Parasiten wie Plasmodium falciparum und Pneumocystis carinii, und Bakterien wie z.B. Staphylococcus aureus; Verbesserung der Immunabwehr und als Mittel zur Prophylaxe der Sepsis bei Patienten mit hohem Infektionsrisiko wie z.B. nach Operation mit großer Infektionsgefahr, Polytraumen, Verbrennungen,
30 Intoxikationen, unter Chemotherapie, bei immunsupprimierten Patienten und Patienten mit prädisponierter Abwehrschwäche; zur medikamentösen Beeinflussung von akuten, chronischen oder allergischen

- 26 -

Entzündungsreaktionen, insbesondere zur Modulation von Entzündungsreaktionen, bei denen apoptotische PMNL und Eosinophile Granulozyten unschädlich gemacht werden sollen; als Heilmittel zur Bekämpfung von Tumorwachstum und -metastasierung; als

5 Angiogenesehemmer zur Bekämpfung von unerwünschter Neoangiogenese, z.B. in Tumoren oder Patienten mit Retinopathie; als Heilmittel für Leukämie, insbesondere chronisch lymphatische Leukämie; zur Verbesserung der Wundheilung, insbesondere bei schlecht heilenden Wunden und in der plastischen Chirurgie; zur Behandlung von Läsionen im

10 Nervensystem, insbesondere bei Erkrankungen, bei denen ein Auswachsen von Neuriten erwünscht ist; zur Verbesserung der Blutstillung, insbesondere bei Patienten mit angeborenen oder erworbenen Blutgerinnungsstörungen oder angeborenen oder erworbenen Thrombozytopathien, unter Antikoagulationstherapie, oder bei Operationen

15 unter Herz-Lungenmaschine; zur Verhinderung von entzündlich bedingten Gewebeschädigungen, z.B. bei a) Reperfusionen (z.B. Schlaganfall, Myokardinfarkt, Abschnürungen)

b) Organtransplantationen (Verhinderung der Transplantatabstoßung) und

20 c) allergischen Reaktionen (incl. Neurodermitis, Asthma bronchiale).

Wenn das erfindungsgemäße Arzneimittel zur Prophylaxe von Erkrankungen eingesetzt wird, kann es allein oder in Kombination mit Interaktionspartnern oder anderen Medikamenten auch in Spülflüssigkeiten als Zusatz z.B. für

25 Mund, Vagina, Anus und Augen, als Zusatz zur Vorkehrung gegen Übertragung von Infektionen bei sexuellen Kontakten (wie z.B. Kondomen, Diaphragmen etc.) und in Lösungen, Pflastern und Wundauflagen zur Wundpflege angewandt werden.

30 Die Anwendung des erfindungsgemäßen Arzneimittels ist lokal, intradermal, oberflächlich, intraperitoneal, intravenös, intramuskulär, oral oder über Vesikel in einer der oben genannten Applikationsformen denkbar.

- 27 -

Eventuelle andere Applikationsarten sind ebenfalls von der vorliegenden Erfindung umfasst.

Die vorliegende Erfindung wird im Folgenden noch durch die Abbildungen
5 und die Beschreibungen dazu erläutert:

Abbildung 1: IDAAT vermittelt die TSP-1 Bindung an Monozyten

TSP-1 positive Monozyten wurden mit dem monoklonalen anti TSP
Antikörper Klon P10, der mit Phycoerythrin konjugiert war, markiert und die
10 Fluoreszenz der Monozyten im Durchflußzytometer gemessen

- a) 3000 gemessene Monozyten: Monozyten mit Hepes-Tyrode Puffer
pH 7.4 30 min inkubiert; gewaschen und mit P10-PE markiert
- b) 3000 gemessene Monozyten: Monozyten mit TSP-1 (10 µg/ml) in
Hepes-Tyrode Puffer pH7.4 30 min, RT inkubiert; gewaschen und
15 mit P10-PE markiert
- c) 3000 gemessene Monozyten: Monozyten mit TSP-1 (10 µg/ml) und
IDAAT (10 µg/ml) in Hepes-Tyrode Puffer pH7.4 30 min, RT
inkubiert; gewaschen und mit P10-PE markiert
- d) Monozyten mit und ohne Zusatz von TSP-1 (10 µg/ml) mit IDAAT in
20 steigenden Konzentrationen inkubiert (s.o.); IDAAT vermittelt die
Bindung von exogen zugesetztem und endogen vorhandenem TSP-1

Abbildung 2: IDAAT vermittelt die TSP-1 Bindung an apoptotische
polymorphkernige Granulozyten (PMNL)

- 25 a) PMNL wurden durch Inkubation in Zellkulturmedium für 24 Stunden
im Inkubator nach Savill et al., 1992 apoptotisch gemacht.
Apoptotische PMNL wurden mit Hepes-Tyrode Puffer pH7.4 30 min
inkubiert, gewaschen, mit anti TSP AK P10-PE markiert und die
Fluoreszenz von 3000 Zellen durchflußzytometrisch gemessen
- 30 b) PMNL wurden durch Inkubation in Zellkulturmedium für 24 Stunden
im Inkubator nach Savill et al., 1992 apoptotisch gemacht.
Apoptotische PMNL wurden mit TSP-1 (5 µg/ml) und IDAAT (10

- 28 -

$\mu\text{g/ml}$) in Hepes-Tyrode Puffer pH7.4 30 min inkubiert, gewaschen, mit TSP AK P10-PE markiert und die Fluoreszenz von 3000 Zellen durchflußzytometrisch gemessen.

- 5 c) Durchführung analog a und b: IDAAT in steigenden Konzentrationen eingesetzt. IDAAT vermittelt die Bindung von endogen vorhandenem und exogen zugesetztem ($10 \mu\text{g/ml}$) Thrombospondin.

Abbildung 3: IDAAT quervernetzt apoptotische PMNL mit Monozyten durch TSP

- 10 Elutrierte PMNL und elutrierte Monozyten wurden mit TSP und IDAAT in unterschiedlichen Konzentrationen für 30 min bei RT miteinander inkubiert und die Zellen fixiert. Die PMNL wurden mit einem monoklonalen FITC-konjugierten Antikörper gegen CD16b und die Monozyten mit anti CD14-PE markiert. PE und FITC positive Assoziate wurden mit dem
15 Durchflußzytometer gemessen.

- Abbildung 4: In „Transwell“-Zellkultur-Kammern (Costar, Bodenheim) wurde je ein mit einer mikroporösen Polycarbonat-Membran bespannter „Transwell“-Einsatz pro einer der 24-Vertiefungen plziert. Die
20 Polycarbonat-Membran mit einer Porengröße von $5 \mu\text{m}$ wurde mit Fibronectin beschichtet und darauf humane mikrovaskuläre Endothelzellen (HMEC-1) bis zur Konfluenz kultiviert.

- Durch Dichtegradientenzentrifugation isolierte humane Monozyten ($200 \mu\text{l}$ mit 2×10^7 Zellen/ml in DMEM aus dem periphären Blut) wurden nach einem
25 Tag in Kultur in den oberen „Transwell“-Einsatz gegeben und für 4 Stunden bei 37°C , $7\% \text{CO}_2$ mit dem HMEC-1 Monolayer inkubiert. Als Maß für die Transmigrationsrate wurde die Anzahl der Monozyten im unteren „Transwell“-Kompartiment unter dem Transwell-Einsatz bestimmt.

- Um den Einfluß von verschiedenen ATIII-Präparaten auf die
30 Transmigrationsrate der Monozyten zu untersuchen, wurden entweder Monozyten, oder Endothelzellen für 10 min mit den Testsubstanzen vorinkubiert und gewaschen oder die Testsubstanzen dem Medium in der

oberen „Transwell“-Kammer zugesetzt und die Testsubstanzen während des kompletten Transmigrationsversuchs dort belassen. Hier ist der Zusatz zum Medium während der Transmigration dargestellt.

5 Nach 4 Stunden Transmigrationsdauer wurden die Einsätze vorsichtig entfernt, die Zellkulturplatte für 30 min zur Ablösung der adhärenzten Monozyten auf Eis gestellt und die Zahl der transmigrierten Monozyten ausgezählt.

10 **Abbildung 5:** IDAAT aktiviert Monozyten und ruft ein Ca^{2+} -Signal hervor. Die angewandte Methodik wurde in der Beschreibung des Beispiels detailliert dargestellt.

Abbildung 6: IDAAT vermittelt die Anbindung von TSP-1 an T-Zellen
Kultivierte humane T-Zellen (Jurkatzellen) wurden für 1 Stunde bei RT mit
15 IDAAT oder IDAAT plus TSP-1 in den angegebenen Konzentrationen inkubiert. An die T-Zellen gebundenes TSP-1 wurde durch den monoklonalen PE-konjugierten anti TSP Antikörper (Klon P10) markiert und im Durchflußzytometer gemessen. IDAAT vermittelt die Bindung von endogen vorhandenem und exogen zugesetztem TSP an T-Zellen.

- 20 a) ohne TSP-1 Zusatz; ohne IDAAT Zusatz; anti TSP-AK-PE-Markierung
b) TSP-1 Zusatz (25 $\mu\text{g/ml}$); ohne IDAAT Zusatz; anti TSP-AK-PE-Markierung
c) TSP-1 Zusatz (25 $\mu\text{g/ml}$); IDAAT Zusatz (1 $\mu\text{g/ml}$); anti TSP-AK-PE-Markierung
25 d) TSP-1 Zusatz (25 $\mu\text{g/ml}$); IDAAT Zusatz (5 $\mu\text{g/ml}$); anti TSP-AK-PE-Markierung
e) Plus/minus TSP-1 (25 $\mu\text{g/ml}$); IDAAT in steigenden Konzentrationen; anti TSP-AK-PE-Markierung

30 **Abbildung 7:** IDAAT verstärkt die aktivierende Wirkung von fLMF auf den oxidativen Burst von PMNL

- a) fLMF löst dosisabhängig den oxidativen Burst der PMNL aus

- 30 -

- b) IDAAT steigert den durch fLMF ausgelösten oxidativen Burst und ist unabhängig von anderen Agonisten selbst in der Lage, den oxidativen Burst in PMNL zu induzieren

5 **Abbildung 8:** IDAAT inhibiert die Freisetzung von aktivem Interleukin 12 durch mit Interferon γ + *S. aureus* aktivierte Monozyten
Die angewandte Methodik wurde in der Beschreibung des Beispiels detailliert dargestellt.

10 **Abbildung 9:** Die IL-10 Sekretion von mit *S. aureus* und Interferon γ aktivierten Monozyten wird durch IDAAT gesteigert. Damit fördert IDAAT die Sekretion eines Interleukins, welches im Tierexperiment vor LPS induzierter Lethalität schützt. Die angewandte Methodik wurde analog Abbildung 8 durchgeführt. IL-10 wurde mittels ELISA bestimmt.

15 **Abbildung 10:** Die TNF α -Sekretion von mit *S. aureus* und Interferon γ aktivierten Monozyten wird durch das TSP-1 Peptid RFYVVMWK inhibiert (10a). IDAAT steigert die inhibierende Wirkung des TSP-1 Peptids (25 μ M) (10b). TNF α wurde mittels ELISA bestimmt. Die angewandte Methodik
20 wurde analog Abbildung 8 durchgeführt.

Abbildung 11: IDAAT inhibiert die Arthus Reaktion im Ohr von Balb-C Mäusen

- a) Zweimal zum Zeitpunkt 0 und 0 + 3 Stunden je 50 μ g IDAAT i.p.
25 behandelte Maus. Arthus Reaktion im linken Ohr
- b) Zweimal Kontrollpuffer i.p. behandelte Maus. Arthus Reaktion im linken Ohr
- c) In den Ohren eingelagertes BSA-FITC als Maß für die Arthus Reaktion in mit IDAAT oder Kontrollpuffer behandelten Mäusen.
30 Arthus Reaktion im linken Ohr.

Abbildung 12:

- 31 -

- a) Dot-Plot Darstellung der Thrombozyten-Bakterien-Assoziation
- A: Thrombozyten markiert mit PE-konjugiertem anti GPIX Antikörper (Beb 1)
- B: Bakterien (*S. aureus*) markiert mit Syto 13
- 5 C: Beide Fluoreszenzen emittierende Bakterien-Thrombozyten-Assoziate
- b) *S. aureus* (Cowan 1)-Thrombozyten-Assoziate
- Verwendung von Thrombozyten der Patienten A.P. und W.K. mit "Gray-platelet-syndrom". Die Zunahme der Assoziatrate durch Aktivierung mit
- 10 Thrombin fehlt bei Verwendung von „Gray“-Plättchen, denen das Thrombospondin-1 fehlt.
- $**p < 0.005$
- $***p < 0.0001$
- 15 c) Die *S. aureus* (Cowan-1)-Thrombozyten-Assoziatbildung wird durch IDAAT gesteigert. Zusätzliche Zugabe von TSP-1 führt zu einer weiteren Steigerung der Anzahl der Assoziate.
- Abbildung 13: Gereinigtes Ca^{2+} -haltiges TSP-1 aus humanen
- 20 Thrombozyten wurde mit FITC (TSP-1-FITC) konjugiert und zu gelfiltrierten Plättchen gegeben. Dieser Ansatz wurde für 1 Stunde bei RT mit IDAAT (2 $\mu\text{g/ml}$ und 5 $\mu\text{g/ml}$) inkubiert und im Durchflußzytometer gemessen (5000 Thrombozyten)
- 25 **Abbildung 14:**
- a) Gelfiltrierte humane Thrombozyten (50.000/ μl) wurden mit 150 $\mu\text{g/ml}$ FITC-konjugiertem Fibrinogen versetzt und mit Kollagen in aufsteigenden Konzentrationen in Abwesenheit oder Anwesenheit von IDAAT (5 $\mu\text{g/ml}$) inkubiert. Nach 30 minütiger Inkubation
- 30 wurden die Thrombozyten im Durchflußzytometer gemessen.
- b) Gelfiltrierte humane Thrombozyten (50.000/ μl) wurden mit 150 $\mu\text{g/ml}$ FITC-konjugiertem Fibrinogen versetzt und IDAAT ohne TSP oder mit

TSP-1 (10 µg/ml) in aufsteigenden Konzentrationen zugesetzt. Nach 1 stündiger Inkubation wurden die Thrombozyten im Durchflußzytometer gemessen.

5 **Abbildung 15:**

- a) IDAAT steigert die Adhäsion von Thrombozyten an Adhäsionsproteine: Fibronectin, Vitronectin, Fibrinogen, Thrombospondin-1 und Kollagen
- b) Vergleich von IDAAT und handelsüblichen ATIII-Präparaten auf die Wirkung der Plättchenadhäsion. Die angewandte Methodik wurde in
- 10 der Beschreibung des Beispiels detailliert dargestellt.

Abbildung 16:

- a) Die IDAAT vermittelte Adhäsion von Thrombozyten an immobilisiertes Thrombospondin-1 wird durch lösliche Integrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ (5 µg/ml) bzw. $\alpha_v\beta_3$ (5 µg/ml) komplett gehemmt. Die angewandte Methodik wurde in der Beschreibung des Beispiels detailliert
- 15 dargestellt.
- b) Die IDAAT vermittelte Adhäsion von Thrombozyten an immobilisiertes Vitronectin wird teilweise durch lösliche Integrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ (5 µg/ml) bzw. $\alpha_v\beta_3$ (5 µg/ml) gehemmt. Die angewandte Methodik wurde in der Beschreibung des Beispiels detailliert
- 20 dargestellt.

- 25 **Abbildung 17:** Die IDAAT vermittelte Adhäsion von Thrombozyten an immobilisiertes TSP-1 wird durch den CD36 spezifischen Antikörper Klon 37, bei gleichzeitiger Blockade des Fc-Rezeptors durch IV.3 vollständig gehemmt. Alleinige Fc-Rezeptor-Blockade hat keinen Einfluß. Die angewandte Methodik wurde in der Beschreibung des Beispiels detailliert
- 30 dargestellt.

Abbildung 18: Die IDAAT vermittelte Thrombozytenadhäsion wurde mit Hirudin (20 U/ml) antikoagulierte Plättchenreichen Plasma durchgeführt. Die angewandte Methodik wurde in der Beschreibung des Beispiels detailliert dargestellt.

5

Abbildung 19: Die IDAAT vermittelte Adhäsion von Thrombozyten an TSP-1 ist abhängig von zweiwertigen Ionen.

EDTA (5 mM) hemmt diese IDAAT-Wirkung vollständig. 1 mM Ca^{2+} steigert diese IDAAT Wirkung deutlich. Die angewandte Methodik wurde in der Beschreibung des Beispiels detailliert dargestellt.

10

Abbildung 20: Zusatz von löslichem TSP-1 hemmt die Adhäsion von Thrombozyten an Kollagen dosisabhängig, während IDAAT, welches TSP-1 immobilisiert, die Adhäsion von Thrombozyten an Kollagen dosisabhängig steigert. Die angewandte Methodik wurde in der Beschreibung des Beispiels detailliert dargestellt.

15

Abbildung 21: Zusatz von Monozyten (100/ μl) zu Thrombozyten (300.000/ μl) steigert die Adhäsion von Thrombozyten an TSP-1, während Zusatz von Erythrozyten (20.000/ μl) eine hemmende Wirkung hat. Die angewandte Methodik wurde in der Beschreibung des Beispiels detailliert dargestellt.

20

Abbildung 22: Die IDAAT induzierte Thrombozytenadhäsion wurde durch Inhibitoren der PI-3-Kinase Wortmannin (20 nM) und LY294002 (50 μM) gehemmt. Wortmannin und LY294002 wurden dazu für 10 min vor IDAAT-Zusatz vorinkubiert.

25

Abbildung 23: IDAAT vermittelt die Thrombospondin medierte Thrombozytenaggregation

30

Die Thrombozytenaggregation wurde nach Born 1962 durchgeführt. Zu gefiltrierten Plättchen (200.000/ μl) in HEPES-Tyrode Puffer pH7.4 mit 100

- 34 -

$\mu\text{g/ml}$ Fibrinogen wurde in einer Aggregationsküvette TSP-1 ($25 \mu\text{g/ml}$) pipettiert. Lösliches TSP-1 löste keine Aggregation aus. Zusatz von IDAAT führte zu einer schwachen Aggregationsreaktion. Gleichzeitige Gabe von IDAAT und löslichem TSP-1 führte zu einer starken Aggregatbildung.

5

Abbildung 24: IDAAT vermittelt die Mikropartikelbildung von Thrombozyten Gelfiltrierte Plättchen ($50.000/\mu\text{l}$) wurden mit dem TSP-1 Peptid RFYVVMWK ($40 \mu\text{M}$) aktiviert und IDAAT in steigenden Konzentrationen zugesetzt. Nach 30 min Inkubation wurden Plättchen und aus Plättchen-entstandenen Mikropartikel mit anti GPIX-PE markiert und die Zahl der
10 entstandenen Mikropartikel im Verhältnis zu 5000 gezählten Plättchen im Durchflußzytometer gemessen.

Abbildung 25: IDAAT vermittelt die TSP-1 Bindung an Endothelzellen
15 Die Methodik wurde detailliert in der Beschreibung des Beispiels dargestellt. IDAAT verstärkt die TSP-1 Bindung an Endothelzellen.

Abbildung 26: IDAAT steigert die Bindung von Thrombozyten an Vitronectin ummantelte Latex-Beads. Die Methodik wurde detailliert in der
20 Beschreibung des Beispiels dargestellt.

Abbildung 27:

- a) IDAAT besteht aus polymerem ATIII, dargestellt mit dem „Rotary-Shadowing“-Elektronenmikroskopieverfahren
- 25 b) Handelsübliches ATIII besteht aus monomären globulären Molekülen; elektronenmikroskopische Aufnahme nach Rotationsbedampfung
- c) IDAAT (1 mg/ml) und TSP-1 ($200 \mu\text{g/ml}$) wurden 1 Stunde bei RT miteinander inkubiert. IDAAT und TSP-1 bilden zusammen große Assoziate; elektronenmikroskopische Aufnahme nach
30 Rotationsbedampfung
- d) Handelsübliches ATIII (1 mg/ml) und TSP-1 ($200 \mu\text{g/ml}$) wurden 1 Stunde bei RT miteinander inkubiert. Handelsübliches AT III und

TSP-1 reagierten nicht miteinander; elektronenmikroskopische Aufnahme nach Rotationsbedampfung

Abbildung 28: IDAAT bindet direkt an CD4

- 5 Rekombinantes CD4 ($1 \mu\text{g}/100 \mu\text{l/well}$) wurde an den Boden einer ELISA-Platte (Nunc-Maxisorb) gebunden. Die Platte wurde mit PBS pH 7,4, 0,5 % Tween 20 gründlich gewaschen und freie Plätze auf der Plastikoberfläche mit 3 % BSA für 1 Stunde bei Raumtemperatur geblockt. Die Platte wurde
- 10 wieder gewaschen und anschließend IDAAT bzw. handelsübliches ATIII in aufsteigenden Konzentrationen von 0 - $5 \mu\text{g/ml}$ für 1 Stunde bei RT zugesetzt. Die ATIII-Lösungen wurden entfernt, die Platte gründlich gewaschen und mit einem polyklonalen monospezifischen Antikörper gegen ATIII aus dem Kaninchen DAKO, Hamburg) in einer Verdünnung von 1:15000 in PBS, 1 % NGS (normal goat serum) inkubiert. Die Platte wurde
- 15 erneut gewaschen und anschließend mit einem affinitätsgereinigten Antikörper aus der Ziege gegen Kaninchen IgG, der mit Peroxidase konjugiert war (BIORAD, München) in einer Verdünnung von 1:3000 inkubiert. Die Platte wurde wieder mehrfach gewaschen und mit Substratlösung ($100 \mu\text{l/well}$) (20 mg ortho-Phenyldiamin, 5 % H_2O_2 in
- 20 einem Puffer aus 12,15 ml 0,1 M Zitronensäure und 12,85 ml 0,2 M Na_2HPO_4 plus 25 ml Aqua dest.) versetzt.
- Die Extinktion bei 405 nm gemessen im ELISA-Photometer spiegelt die Menge an gebundenem Antithrombin wieder. Die Reaktion wurde mit $50 \mu\text{l/well}$ 4 N H_2SO_4 gestoppt und die Extinktion bei 490 nm gemessen. Die
- 25 Reaktion zeigt deutlich, dass IDAAT nicht nur TSP-1 vermittelt, sondern auch direkt an CD4 binden kann.

Abbildung 29: IDAAT bindet direkt an HIV-GP120

- 30 Rekombinantes HIV-GP120 ($1 \mu\text{g}/100 \mu\text{l/well}$) wurde an den Boden einer ELISA-Platte (Nunc-Maxisorb) gebunden. Die Platte wurde mit PBS pH 7,4, 0,05 % Tween 20 gründlich gewaschen und freie Plätze auf der Plastikoberfläche mit 3 % BSA für 1 Stunde bei Raumtemperatur geblockt.

- 36 -

Die Platte wurde wieder gewaschen und anschließend IDAAT bzw. handelsübliches ATIII in aufsteigenden Konzentrationen von 0 - 5 µg/ml für 1 Stunde bei RT zugesetzt. Die ATIII-Lösungen wurden entfernt, die Platte gründlich gewaschen und mit einem polyklonalen monospezifischen Antikörper gegen ATIII aus dem Kaninchen (DAKO, Hamburg) in einer Verdünnung von 1 : 15000 in PBS, 1 % NGS (normal goat serum) inkubiert. Die Platte wurde erneut gewaschen und anschließend mit einem affinitätsgereinigten Antikörper aus der Ziege gegen Kaninchen IgG, der mit Peroxidase konjugiert war (BIORAD, München), in einer Verdünnung von 1 : 3000 inkubiert. Die Platte wurde wieder mehrfach gewaschen und mit Substratlösung (100 µl/well) (20 mg ortho-Phenyldiamin, 5 % H₂O₂ in einem Puffer aus 12,15 ml 0.1 M Zitronensäure und 12,85 ml 0.2 M Na₂HPO₄ plus 25 ml Aqua dest.) versetzt.

Die Extinktion bei 405 nm gemessen im ELISA-Photometer spiegelt die Menge an gebundenem Antithrombin wieder. Die Reaktion wurde mit 50 µl/well 4 N H₂SO₄ gestoppt und die Extinktion bei 490 nm gemessen. Die Reaktion zeigt deutlich, dass IDAAT nicht nur TSP-1 vermittelt, sondern auch direkt an HIV-GP120 binden kann.

Abbildung 30: IDAAT bindet direkt an Thrombospondin

Gereinigtes Thrombospondin-1 (1 µg/100 µl/well) wurde an den Boden einer ELISA-Platte (Nunc-Maxisorb) gebunden. Die Platte wurde mit PBS pH 7,4, 0,05 % Tween 20 gründlich gewaschen und freie Plätze auf der Plastikoberfläche mit 3 % BSA für 1 Stunde bei Raumtemperatur geblockt. Die Platte wurde wieder gewaschen und anschließend IDAAT bzw. handelsübliches ATIII in aufsteigenden Konzentrationen von 0 - 5 µg/ml für 1 Stunde bei RT zugesetzt. Die ATIII-Lösungen wurden entfernt, die Platte gründlich gewaschen und mit einem polyklonalen monospezifischen Antikörper gegen ATIII aus dem Kaninchen (DAKO, Hamburg) in einer Verdünnung von 1 : 15000 in PBS, 1 % NGS (normal goat serum) inkubiert. Die Platte wurde erneut gewaschen und anschließend mit einem affinitätsgereinigten Antikörper aus der Ziege gegen Kaninchen IgG, der mit

Peroxidase konjugiert war (BIORAD, München), in einer Verdünnung von 1 : 3000 inkubiert. Die Platte wurde wieder mehrfach gewaschen und mit Substratlösung (100 μ l/well) (20 mg ortho-Phenyldiamin, 5 % H_2O_2 in einem Puffer aus 12,15 ml 0.1 M Zitronensäure und 12,85 ml 0.2 M Na_2HPO_4 plus 25 ml Aqua dest.) versetzt.

Die Extinktion bei 405 nm gemessen im ELISA-Photometer spiegelt die Menge an gebundenem Antithrombin wieder. Die Reaktion wurde mit 50 μ l/well 4 N H_2SO_4 gestoppt und die Extinktion bei 490 nm gemessen. Die Reaktion zeigt deutlich, dass IDAAT direkt an TSP-1 binden kann.

Abbildung 31: IDAAT bindet direkt an Vitronectin (aktive Form)

Vitronectin (1 μ g/100 μ l/well) wurde an den Boden einer ELISA-Platte (Nunc-Maxisorb) gebunden. Die Platte wurde mit PBS pH 7,4, 0,05 % Tween 20 gründlich gewaschen und freie Plätze auf der Plastikoberfläche mit 3 % BSA für 1 Stunde bei Raumtemperatur geblockt. Die Platte wurde wieder gewaschen und anschließend IDAAT bzw. handelsübliches ATIII in aufsteigenden Konzentrationen von 0 - 5 μ g/ml für 1 Stunde bei RT zugesetzt. Die ATIII-Lösungen wurden entfernt, die Platte gründlich gewaschen und mit einem polyklonalen monospezifischen Antikörper gegen ATIII aus dem Kaninchen (DAKO, Hamburg) in einer Verdünnung von 1 : 15000 in PBS, 1 % NGS (normal goat serum) inkubiert. Die Platte wurde erneut gewaschen und anschließend mit einem affinitätsgereinigten Antikörper aus der Ziege gegen Kaninchen IgG, der mit Peroxidase konjugiert war (BIORAD, München), in einer Verdünnung von 1 : 3000 inkubiert. Die Platte wurde wieder mehrfach gewaschen und mit Substratlösung (100 μ l/well) (20 mg ortho-Phenyldiamin, 5 % H_2O_2 in einem Puffer aus 12,15 ml 0,1 M Zitronensäure und 12,85 ml 0.2 M Na_2HPO_4 plus 25 ml Aqua dest.) versetzt. Die Extinktion bei 405 nm gemessen im ELISA-Photometer spiegelt die Menge an gebundenem Antithrombin wieder. Die Reaktion wurde mit 50 μ l/well 4 N H_2SO_4 gestoppt und die Extinktion bei 490 nm gemessen. Die Reaktion zeigt deutlich, dass IDAAT direkt an aktives Vitronectin binden kann.

Herstellung von IDAAT:

Beispiel 1

Im beschriebenen Sinne nicht funktionsfähiges, nicht aktiviertes
5 Antithrombin III wurde entweder von Calbiochem, Sigma, Enzyme Research
Laboratories, Pharmacia & Upjohn, Aventis, Baxter oder Grifols bezogen
oder aus humanem Plasma gereinigt. Die Antithrombin-Präparate wurden
gegen Phosphat-gepufferte Saline (PBS) pH 7,4 umgepuffert. 348 µg reines
10 Antithrombin wurde mit PBS pH 7,4 und 0,1 mM EDTA auf ein Volumen
von 1 ml gebracht und die Lösung auf Eis gekühlt. Kaltes NaOCl (832 µg)
wurde in einem Volumen von 10 µl zugesetzt und der Ansatz für 10
Minuten auf Eis inkubiert. Die Reaktion wurde durch sofortige Gelfiltration
bei 4 °C über Sephadex G25 (PD10-Säulen) terminiert.

15 Beispiel 2

Handelsübliches, nicht aktiviertes Antithrombin III wurde gegen PBS pH 8,0
umgepuffert. 500 µg reines Antithrombin III wurde mit 50 µg Neutrophile
Granulozyten-Elastase (HNE) (human, gelöst in 50 µl Puffer) versetzt und
der Ansatz (500 µl Volumen) für 16 Stunden bei 37 °C inkubiert. Die
20 Reaktion wurde mit 1 mM (Endkonzentration) Phenylmethylsulfonylfluorid
(PMSF) gestoppt und das Antithrombin III mit dem Centricon-Verfahren
gegen PBS/0,1 mM EDTA pH 7,4 umgepuffert. Anschließend erfolgte eine
Oxidation mit NaOCl wie im Beispiel 1 beschrieben.

25 Beispiel 3

Handelsübliches, nicht aktiviertes Antithrombin III wurde gegen PBS pH 8,0
umgepuffert. 500 µg reines Antithrombin III wurde mit 12,4 µg
Matrixmetalloproteinase-2 (MMP-2) (gelöst in 0,9 % NaCl) in 25 mM
Tris/HCl/30 mM NaCl/10 mM Ca²⁺-Puffer angesetzt. Um die MMP-2 zu
30 aktivieren, wurde sie für 2 Stunden bei RT mit 1 mM APMA (4-amino-
phenylmercuric acetate) vorbehandelt. Der Ansatz (500 µl Volumen) wurde

- 39 -

für 16 Stunden bei 37°C inkubiert. Das Antithrombin III wurde mit dem Centricon-Verfahren gegen PBS pH 7,4 umgepuffert.

Beispiel 4

- 5 Handelsübliches, nicht aktiviertes Antithrombin III wurde gegen PBS pH 8,0 umgepuffert. 200 µg reines Antithrombin III wurde mit Defensin 2 (HNP-2, gelöst in 0,9 % NaCl, Endkonzentration 10 µM) in PBS pH 8,0 für 1 Stunde bei RT inkubiert.

10

- 40 -

Referenzen

1. Armant M, Avice MN, Hermann P, Rubio M, Kiniwa M, Delespesse G, Sarfati M: CD47 ligation selectively downregulates human interleukin 12
5 production. J.Exp.Med. 190:1175-1182,1999
2. Asch AS, Liu 1, Briccetti FM, Barnwell JW, Kwakye-Berko F, Dokun A, Goldberger J, Pernambuco M: Analysis of CD36 binding domains: ligand
10 specificity controlled by dephosphorylation of an ectodomain. Science
262: 1436-1440, 1993
3. Barnes DA, Tse J, Kaufhold M, Owen M, Hesseigesser J, Strieter R, Horuk R, Perez HD: Polyclonal antibody directed against human RANTES
ameliorates disease in the Lewis rat adjuvant-induced arthritis model.
15 J.Clin.Invest 101: 2910-2919 1998
4. Born GV: [The blood platelets in thrombogenesis. The mechanism
and inhibition of the aggregation of blood platelets].
Actual.Pharmacol.(Paris) 18: 17-32, 1965
20
5. Bornstein P, Devarayalu S, Li P, Disteché CM, Framson P: A second
thrombospondin gene in the mouse is similar in organization to
thrombospondin 1 but does not respond to serum.
Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 88: 8636-8640,1991
25
6. Bornstein P: Thrombospondins: structure and regulation of
expression [published erratum appears in FASEB J 1993 Jan; 7(1):237].
FASEB J. 6: 3290-3299, 1992
- 30 7. Chung J, Gao AG, Frazier WA: Thrombospondin acts via integrin-
associated protein to activate the platelet integrin α IIb β 3.
J.Biol.Chem. 272: 14740-14746, 1997

- 41 -

8. Chung J, Wang XQ, Lindberg FP, Frazier WA: Thrombospondin-1 acts via IAP/CD47 to synergize with collagen in alpha2betal-mediated platelet activation. Blood 94: 642-6489 1999
- 5 9. Crawford SE, Stellmach V, Murphy-Ullrich JE, Ribeiro SM, Lawler J, Hynes RO, Boivin GP, Bouck N: Thrombospondin-1 is a major activator of TGF-beta1 in vivo. Cell 93: 1159-1170, 1998
- 10 10. Crombie R, Sitverstein RL, MacLow C, Pearce SFA, Nachman RL, Laurence J: Identification of a CD36-related thrombospondin 1-binding domain in HIV- 1 envelope glycoprotein gp120: relationship to HIV-1-specific inhibitory factors in human saliva. J.Exp.Med. 187: 25-35, 1998
- 15 11. Dardik R, Lahav J: Functional changes in the conformation of thrombospondin-1 during complexation with fibronectin or heparin. Exp.Cell Res. 248: 407-414,1999
- 20 12. Demeure CE, Tanaka H, Mateo V, Rubio M, Delespesse G, Sarfati M: CD47 engagement inhibits cytokine production and maturation of human dendritic cells. J.Immunol. 164: 2193-2199, 2000
- 25 13. Dickneite G, Paques EP: Reduction of mortality with antithrombin 111 in septicemic rats: a study of Klebsiella pneumoniae induced sepsis. Thromb.Haemost. 69: 98-102, 1993
- 30 14. Dörmann D, Kardoeus J, Zimmermann RE, Kehrel B: Flow cytometric analysis of agonist-Induced annexin V, factor Va and factor Xa binding to human platelets. Platelets 9: 171-1771 1998
15. Fadok VA, Bratton DL, Konowal A, Freed PW, Westcott JY, Henson PM: Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine

- 42 -

mechanisms involving TGF-beta, PGE2, and PAF. J.Clin.Invest 101: 890-8982, 1998

16. Galvin NJ, Dixit VM, O'Rourke KM, Santoro SA, Grant GA, Frazier
5 WA: Mapping of epitopes for monoclonal antibodies against human platelet
thrombospondin with electron microscopy and high sensitivity amino acid
sequencing. J.Cell Biol. 101: 1434-1441, 1985
17. Geiser AG, Letterio JJ, Kulkarni AB, Karlsson S, Roberts AB, Sporn
10 MB: Transforming growth factor beta 1 (TGF.beta 1 controls expression o
major histocompatibility genes in the postnatal mouse: aberrant
histocompatibility antigen expression in the pathogenesis of the TGF beta
1 null mouse phenotype. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 90: 9944-9948, 1993
18. Higazi AA, Upson RH, Cohen RL, Manuppello J, Bognacki J, Henkin
15 J, McCrae KR, Kounnas MZ, Strickland DK, Preissner KT, Lawler J, Cines
DB: Interaction of single-chain urokinase with its receptor induces the
appearance and disappearance of binding epitopes within the resultant
complex for other cell surface proteins. Blood 88: 542-5511, 1996
19. Iruela-Arispe ML, Lombardo M, Kruttsch HC, Lawler J, Roberts DD:
20 Inhibition of angiogenesis by thrombospondin-1 is mediated by 2
independent regions within the type 1 repeats. Circulation 100: 1423-
14311, 1999
20. Jander R, Troyer D, Rauterberg J: A collagen-like glycoprotein of the
25 extracellular matrix is the undegraded form of type VI collagen.
Biochemistry 23: 3675-3681, 1984
21. Jimenez B, Volpert OV, Crawford SE, Febbraio M, Silverstein RL,
30 Bouck N: Signals leading to apoptosis-dependent inhibition of
neovascularization by thrombospondin-1. Nat.Med. 6: 41-48, 2000

- 43 -

22. Kainoh M, Imai R, Umetsu T, Hattori M, Nishio S: Prostacyclin and beraprost sodium as suppressors of activated rat polymorphonuclear leukocytes. *Biochem.Pharmacol.* 39: 477-4841, 1990
- 5 23. Kaplan HJ, Leibole MA, Tezei T, Ferguson TA: Fas ligand (CD95 ligand) controls angiogenesis beneath the retina. *Nat.Med.* 5: 292-297, 1999
- 10 24. Kappe S, Bruderer T, Gantt S, Fujioka H, Nussenzweig V, Menard R: Conservation of a gliding motility and cell invasion machinery in Apicomplexan parasites. *J.Cell Biol.* 147: 937-9441, 1999
- 15 25. Kehrel B, Balleisen L, Kokott R, Mesters R, Stenzinger W, Clemetson KJ, van de LJ: Deficiency of intact thrombospondin and membrane glycoprotein Ia in platelets with defective collagen-induced aggregation and spontaneous loss of disorder. *Blood* 71: 1074-10787, 1988
- 20 26. Kehrel B, Kronenberg A, Schwippert B, Niesing-Bresch D, Niehues U, Tschöpe D, van de LJ, Clemetson KJ: Thrombospondin binds normally to glycoprotein IIIb deficient platelets. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 179: 985-991, 1991
- 25 27. Kehrel B, Flicker E: Thrombospondin in Pathophysiology - Thrombospondin in Relation with Disease Processes, in Lahav J (ed): Thrombospondin. Boca Raton, CRC Press, 1993, pp 199-207
- 30 28. Kehrel B, Flicker E, Wigbels B, Osterfeld M, van de LJ, Luscher EF: Thrombospondin measured in whole blood - an indicator of platelet activation. *Blood Coagul.Fibrinolysis* 7: 202-205, 1996
29. Kehrel B, Wierwille S, Clemetson KJ, Anders O, Steiner M, Knight CG, Farndale RW, Okuma M, Barnes MJ: Glycoprotein VI is a major

- 44 -

Collagen receptor for platelet activation: it recognizes the platelet-activating quaternary structure of collagen, whereas CD36, glycoprotein IIb/IIIa, and von Willebrand factor do not. Blood 91: 491-4991, 1998

- 5 30. Kielbassa K, Schmitz C, Gerke V: Disruption of endothelial microfilaments selectively reduces the transendothelial migration of monocytes. Exp.Cell Res. 243: 129-141, 1998
- 10 31. Kronenberg A, Grahl H, Kehrel B: Human platelet CD36 (BPIIb, GPIV) binds to cholesteryl-hemisuccinate and can be purified by a simple two-step method making use of this property. Thromb. Haemost. 79: 1021-1024, 1998
- 15 32. Kulkarni AB, Huh CG, Becker D, Geiser A, Lyght M, Flanders KC, Roberts AB, Sporn MB, Ward JM, Karlsson S: Transforming growth factor beta 1 null mutation in mice causes excessive inflammatory response and early death. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 90: 770-774, 1993
- 20 33. Kulkarni AB, Karlsson S: Inflammation and TGF beta 1: lessons from the TGF beta 1 null mouse. Res.Immunol. 148: 453-456, 1997
- 25 34. Lawler J, Hynes RO: The structure of human thrombospondin, an adhesive glycoprotein with multiple calcium-binding sites and homologies with several different proteins. J.Cell Biol. 103: 1635-1648, 1986
- 30 35. Lawler J: The structural and functional properties of thrombospondin. Blood 67: 1197-1209, 1986
36. Lawler J, Weinstein R, Hynes RO: Cell attachment to thrombospondin: the role of ARG-GLY-ASP, calcium, and integrin receptors. J.Cell Biol. 107: 2351-2361, 1988

- 45 -

37. Lawler J, Duquette M, Urry L, McHenry K, Smith TF: The evolution of the thrombospondin gene family. *J.Mol.Evol.* 36: 509-516, 1993
38. Lawler J, Sunday M, Thibert V, Duquette M, George EL, Rayburn H, Hynes RO: Thrombospondin-1 is required for normal murine pulmonary homeostasis and its absence causes pneumonia. *J.Clin.Invest* 101: 982-9921, 1998
39. Letterio JJ, Geiser AG, Kulkarni AB, Dang H, Kong L, Nakabayashi T, Mackall CL, Gress RE, Roberts AB: Autoimmunity associated with TGF-beta1-deficiency in mice is dependent on MHC class II antigen expression. *J.Clin.Invest* 98: 2109-2119, 1996
40. Leung LL, Li WX, McGregor JL, Albrecht G, Howard RJ: CD36 peptides enhance or inhibit CD36-thrombospondin binding. A two-step process of ligand-receptor interaction. *J.Biol.Chem.* 267: 18244-18250, 1992
41. Li DQ, Lundberg F, Ljungh A: Binding of von Willebrand factor by coagulase-negative staphylococci. *J.Med.Microbiol.* 49: 217-2259, 2000
42. Lindstedt KA, Kokkonen JO, Kovanen PT: Soluble heparin proteoglycans released from stimulated mast cells induce uptake of low density lipoproteins by macrophages via scavenger receptor-mediated phagocytosis. *J.Lipid Res.* 33: 65-75, 1992
43. Mateo V, Lagneaux L, Bron D, Biron G, Armant M, Delespesse G, Sarfati M: CD47 ligation induces caspase-independent cell death in chronic lymphocytic leukemia. *Nat. Med.* 5: 1277-1284, 1999
44. Munjai ID, Crawford DR, Blake DA, Sabet MD, Gordon SR: Thrombospondin: biosynthesis, distribution, and changes associated with

- 46 -

wound repair in corneal endothelium [published erratum appears in Eur J Cell Biol 1991 Aug. 55(2):IV]. Eur.J.Cell Biol. 52: 252-263, 1990

45. Murphy-Ullrich JE, Gurusiddappa S, Frazier WA, Hook M: Heparin-binding peptides from thrombospondins 1 and 2 contain focal adhesion-labilizing activity. J.Biol.Chem. 268: 26784-26789, 1993
46. Nakamura T, Amano A, Nakagawa 1, Hamada S: Specific interactions between Porphyromonas gingivalis fimbriae and human extracellular matrix proteins. FEMS Microbiol.Lett. 175: 267-272, 1999
47. Patthy L: Detecting distant homologies of mosaic proteins. Analysis of the sequences of thrombomodulin, thrombospondin complement components C9, C8 alpha and C8 beta, vitronectin and plasma cell Membrane glycoprotein PC-1. J.Mol.Biol. 202: 689-696, 1988
48. Roberts DD, Sherwood JA, Spitalnik SL, Panton LJ, Howard RJ, Dixit VM, Frazier WA, Miller LH, Ginsburg V: Thrombospondin binds falciparum malaria parasitized erythrocytes and may mediate cytoadherence. Nature 318: 64-66, 1985
49. Roberts DD: Regulation of tumor growth and metastasis by thrombospondin-1. FASEB J. 10: 1183-1191, 1996
50. Santoro SA, Zutter MM, Wu JE, Staats WD, Saelman EU, Keely PJ: Analysis of collagen receptors. Methods Enzymol. 245: 147-183, 1994
51. Savill J, Hogg N, Ren Y, Haslett C: Thrombospondin cooperates with CD36 and the vitronectin receptor in macrophage recognition of neutrophils undergoing apoptosis. J.Clin.Invest 90: 1513-1522, 1992

- 47 -

52. Schultz-Cherry S, Murphy-Ullrich JE: Thrombospondin causes activation of latent transforming growth factor- beta secreted by endothelial cells by a novel mechanism [published erratum appears in J Cell Biol 1993 Sep; 122(5):following 1143]. J.Cell Biol. 122: 923-932, 1993
- 5 53. Schultz-Cherry S, Lawler J, Murphy-Ullrich JE: The type 1 repeats of thrombospondin 1 activate latent transforming growth factor-beta. J.Biol.Chem. 269: 26783-26788, 1994
- 10 54. Shafiee A, Penn JS, Kruttsch HC, Inman JK, Roberts DD, Blake DA: Inhibition of retinal angiogenesis by peptides derived from thrombospondin-1. Invest Ophthalmol.Vis.Sci. 41: 2378-23881, 2000
- 15 55. Shull MM, Ormsby 1, Kier AB, Pawlowski S, Diebold RJ, Yin M, Allen R, Sidman C, Proetzel G, Calvin D: Targeted disruption of the mouse transforming growth factor-beta 1 gene results in multifocal inflammatory disease. Nature 359: 693-699, 1992
- 20 56. Silverstein RL, Nachman RL: Thrombospondin-plasminogen interactions: modulation of plasmin Generation. Semin.Thromb.Hemost. 13: 335-342, 1987
- 25 57. Silverstein RL, Nachman RL, Pannell R, Gurewich V, Harpel PC: Thrombospondin forms complexes with single-chain and two-chain forms of urokinase [published erratum appears in J Biol Chem 1990 Sep 15; 265(26): 16025]. J.Biol.Chem. 265: 11289-11294, 1990
- 30 58. Sozzani S, Molino M, Locati M, Luini W, Cerletti C, Vecchi A, Mantovani A: Receptor-activated calcium influx in human monocytes exposed to monocyte chemotactic protein-1 and related cytokines. J.Immunol. 150: 1544-15531 1993

- 48 -

59. Stangl K, Dschietzig T, Alexiou K, Brunner F: Antithrombin increases pulmonary endothelins: inhibition by heparin and Ca²⁺ channel antagonism. *Eur.J.Pharmacol.* 370: 57-61, 1999
- 5 60. Steinhauser ML, Hogaboam CM, Lukacs NW, Strieter RM, Kunkel SL: Multiple roles for IL-12 in a model of acute septic peritonitis. *J.Immunol.* 162: 5437-5443, 1999
- 10 61. Stern M, Savill J, Hasiett C: Human monocyte-derived macrophage phagocytosis of senescent eosinophils undergoing apoptosis. Mediation by alpha v beta 3/CD36/thrombospondin recognition mechanism and lack of phlogistic response. *Am.J.Pathol.* 149: 911-921, 1996
- 15 62. Sulaiman IM, Lal AA, Arrowood MJ, Xiao L: Biallelic polymorphism in the intron region of beta-tubulin gene of *Cryptosporidium* parasites. *J. Parasitol.* 85: 154-157, 1999
- 20 63. Uchiba M, Okajima K, Murakami K, Okabe H, Takatsuki K: Attenuation of endotoxin-induced pulmonary vascular injury by antithrombin 111. *Am.J.Physiol* 270: L921-L930,1996
- 25 64. Watkins SC, Lynch GW, Kane LP, Slayter HS: Thrombospondin expression in traumatized skeletal muscle. Correlation of appearance with post-trauma regeneration. *Cell Tissue Res.* 261: 73-84, 1990
- 30 65. Wengelnik K, Spaccapelo R, Naitza S, Robson KJ, Janse CJ, Bistoni F, Waters AP, Crisanti A: The A-domain and the thrombospondin-related motif of *Plasmodium falciparum* TRAP are implicated in the invasion process of mosquito salivary glands. *EMBO J.* 18: 5195-5204, 1999

- 49 -

66. Yamauchi T, Umeda F, Inoguchi T, Nawata H: Antithrombin III stimulates prostacyclin production by cultured aortic endothelial cells. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 163: 1404-1411, 1989
- 5 67. Yatohgo T, Izumi M, Kashiwagi H, Hayashi M: Novel purification of vitronectin from human plasma by heparin affinity chromatography. *Cell Struct. Funct.* 13: 281-292, 1988
- 10 68. Yehualaeshet T, O'Connor R, Green-Johnson J, Mai S, Silverstein R, Murphy-Ullrich JE, Khalil N: Activation of rat alveolar macrophage-derived latent transforming growth factor beta-1 by plasmin requires interaction with thrombospondin-1 and its cell surface receptor, CD36. *Am.J.Pathol.* 155: 841-851, 1999

Patentansprüche

1. Arzneimittel, enthaltend aktiviertes Antithrombin III (IDAAT), IDAAT-Peptide, -Analoga oder -Mimetika.
5
2. Arzneimittel nach Anspruch 1,
dadurch gekennzeichnet,
dass es rekombinantes IDAAT oder Peptide oder Analoga davon
10 enthält.
3. Arzneimittel nach einem der Ansprüche 1 oder 2,
dadurch gekennzeichnet,
dass es weitere pharmazeutisch akzeptable Hilfs- oder/und
15 Trägersubstanzen enthält.
4. Arzneimittel nach einem der Ansprüche 1 bis 3,
dadurch gekennzeichnet,
dass es zur lokalen, intradermalen, oberflächlichen, intraperitonealen,
20 intravenösen, orale oder intramuskulären Verabreichung formuliert
ist, oder über Vesikel verabreicht wird.
5. Arzneimittel nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
25 dass es weitere Substanzen wie z.B. Antibiotika, oder
Interaktionspartner des IDAAT im Körper enthält.
6. Verfahren zur Herstellung von aktiviertem Antithrombin III (IDAAT),
dadurch gekennzeichnet,
30 dass man Antithrombin III oxidiert, spaltet und oxidiert, spaltet,
denaturiert, Peptide, wie z.B. Defensin 2, daran koppelt oder
Antithrombin III anderweitig polymerisiert.

7. Verwendung eines Arzneimittels nach einem der Ansprüche 1 bis 5 zur Prophylaxe oder Therapie von akuten Infektionen, Sepsis, akuten, chronischen und/oder allergischen Entzündungsreaktionen, von Tumorwachstum und -metastasierung, zur Bekämpfung von unerwünschter Neoangiogenese, für Leukämie, zur Verbesserung der Wundheilung, zur Behandlung von Läsionen im Nervensystem, zur Verbesserung der Blutstillung sowie zur Verhinderung von entzündlich bedingten Gewebeschädigungen, sowie zur allgemeinen Steigerung der Immunabwehr und zur Inhibition von Entzündungsreaktionen.
8. Verwendung nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass als akute Infektion eine HIV-Infektion behandelt wird.
9. Verwendung nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass insbesondere chronisch lymphatische Leukämie behandelt wird.
10. Verwendung nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass es bei Patienten mit hohem Infektionsrisiko, wie nach Operationen mit großer Infektionsgefahr, Polytraumen, Verbrennungen, Intoxikationen unter Chemotherapie, bei immunsupprimierten Patienten und Patienten mit prädisponierter Abwehrschwäche eingesetzt wird.
11. Verwendung nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass es zur Blutstillung, insbesondere bei Patienten mit angeborenen oder erworbenen Blutgerinnungsstörungen oder angeborenen oder erworbenen Thrombozytopathien, unter Antikoagulationstherapie

- 52 -

oder Thrombozytenprophylaxe oder bei Operationen unter
Herzlungenmaschine eingesetzt wird.

12. Verwendung nach Anspruch 7,
5 dadurch gekennzeichnet,
dass es bei Reperfusionen, Organtransplantationen oder allergischen
Reaktionen eingesetzt wird.
13. Verwendung nach Anspruch 7,
10 dadurch gekennzeichnet,
dass parasitäre Erkrankungen, insbesondere Malaria tropica,
behandelt werden.

Fig. 1:

IDAAT vermittelt TSP-1 Anbindung an Monozyten

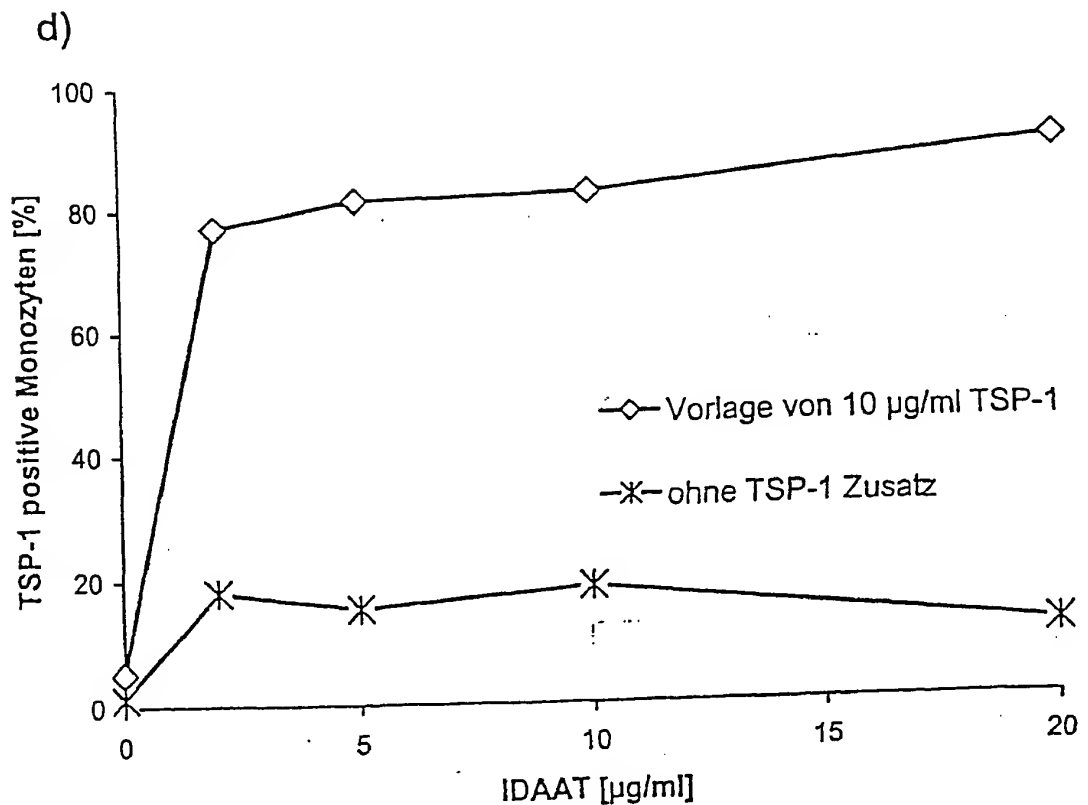
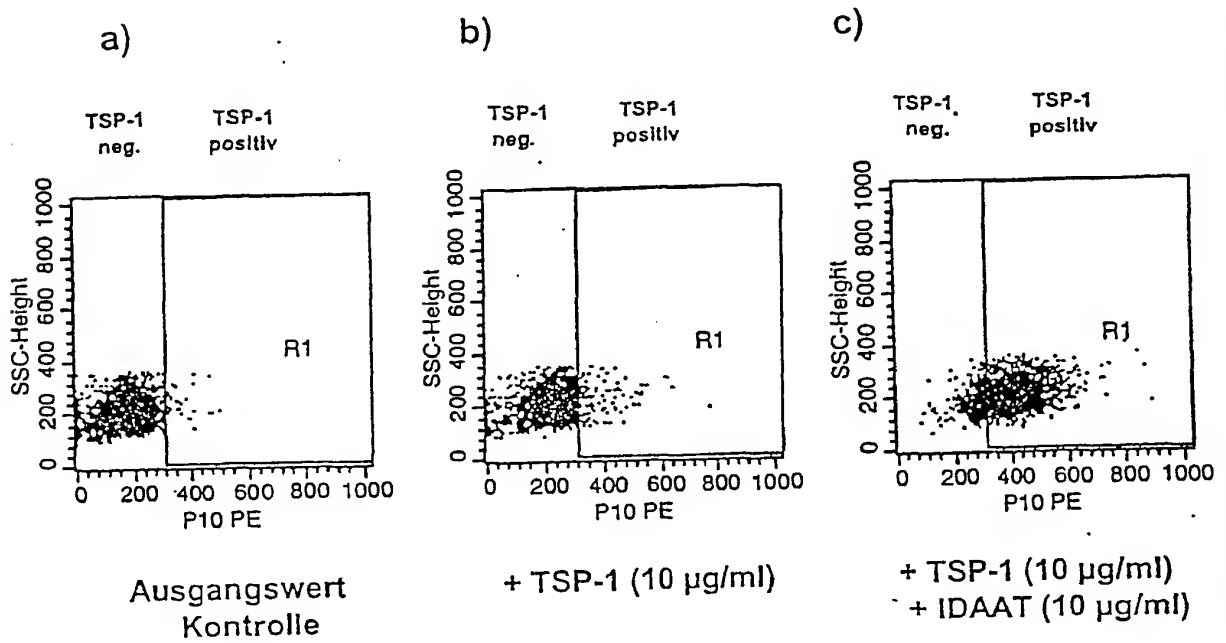


Fig. 2:

IDAAT vermittelt TSP-1 Anbindung an apoptotische PMNL

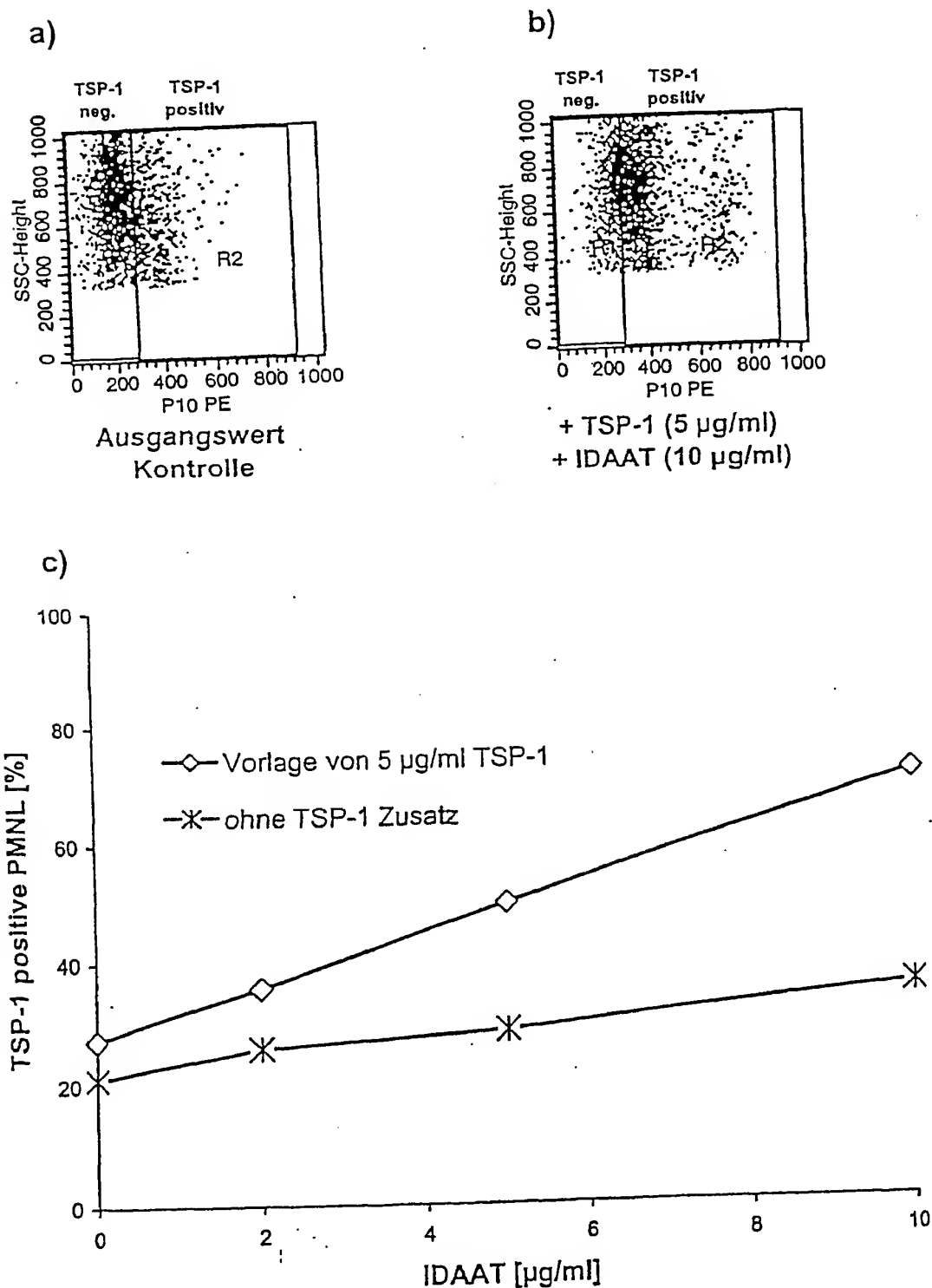


Fig 3:

IDAAT quervernetzt apoptotische PMNL mit Monozyten
durch TSP

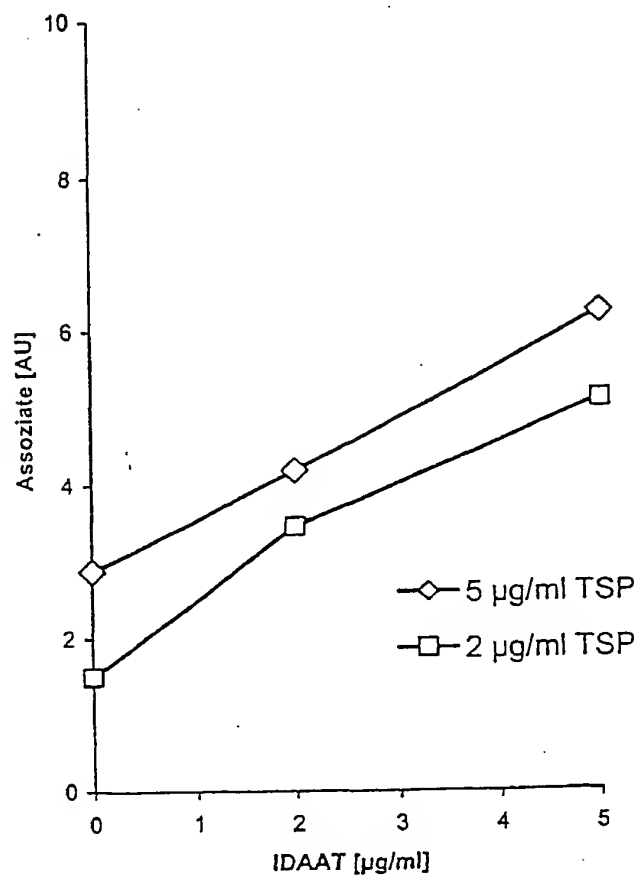


Fig 4:

Transmigration von Monozyten durch
HMEC-1 Monolayer unter dem Einfluß von IDAAT und
handelsüblichen ATIII-Präparaten

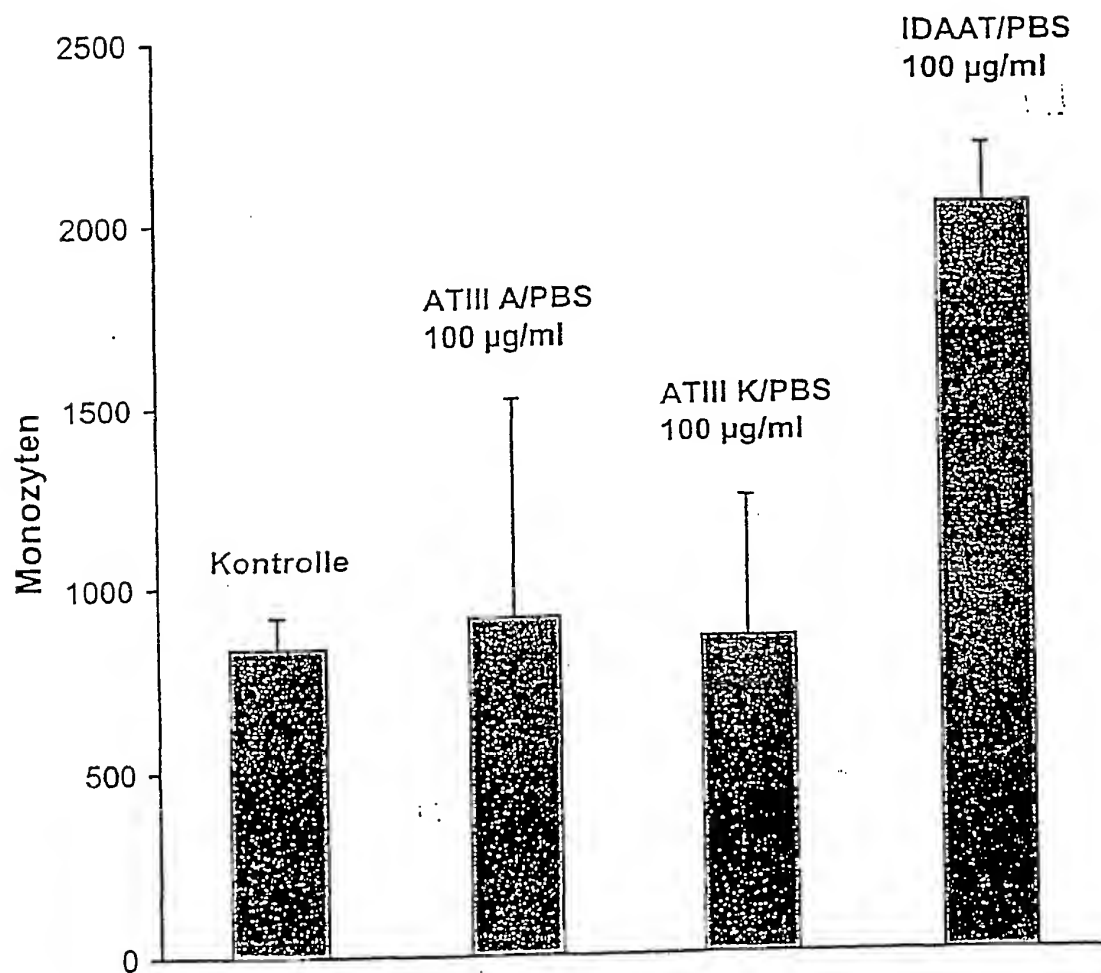


Fig 5:

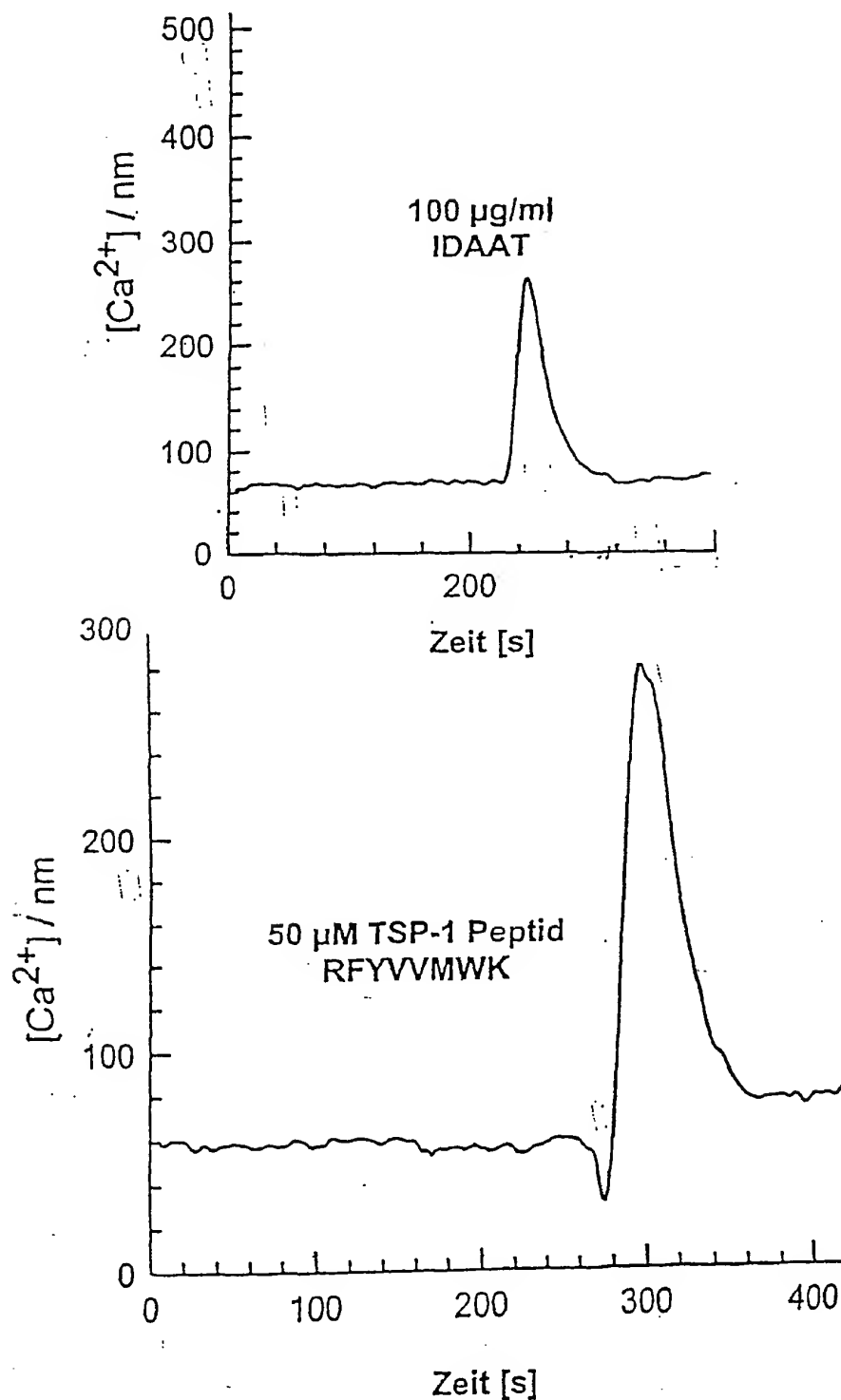
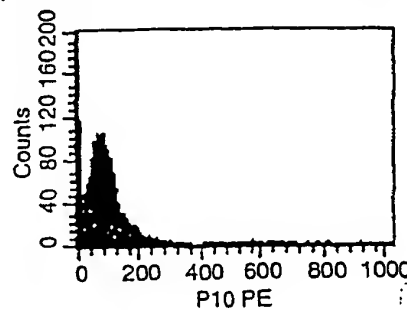
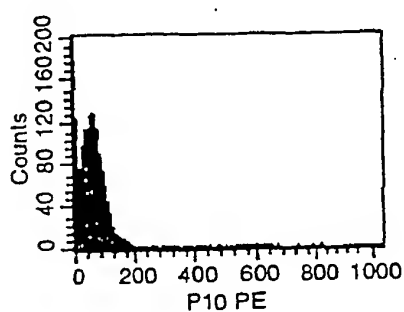
IDAAT induziert Ca^{2+} -Signal in Thrombozyten

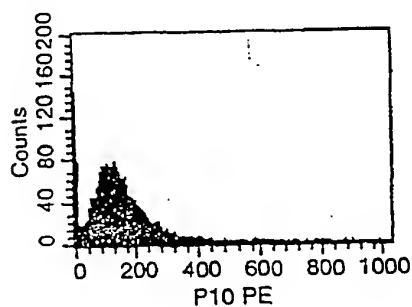
Fig 6:

IDAAT vermittelt die Anbindung von TSP-1 an T-Zellen

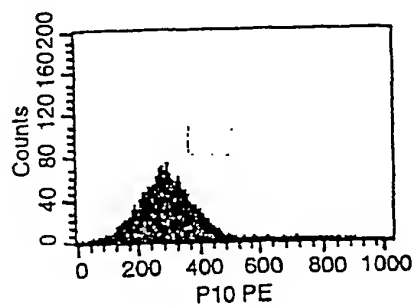
a) ohne TSP-1, ohne IDAAT-Zusatz b) 25 µg/ml TSP-1, ohne IDAAT



c) 25 µg/ml TSP-1, 1 µg/ml IDAAT



d) 25 µg/ml TSP-1, 5 µg/ml IDAAT



e)

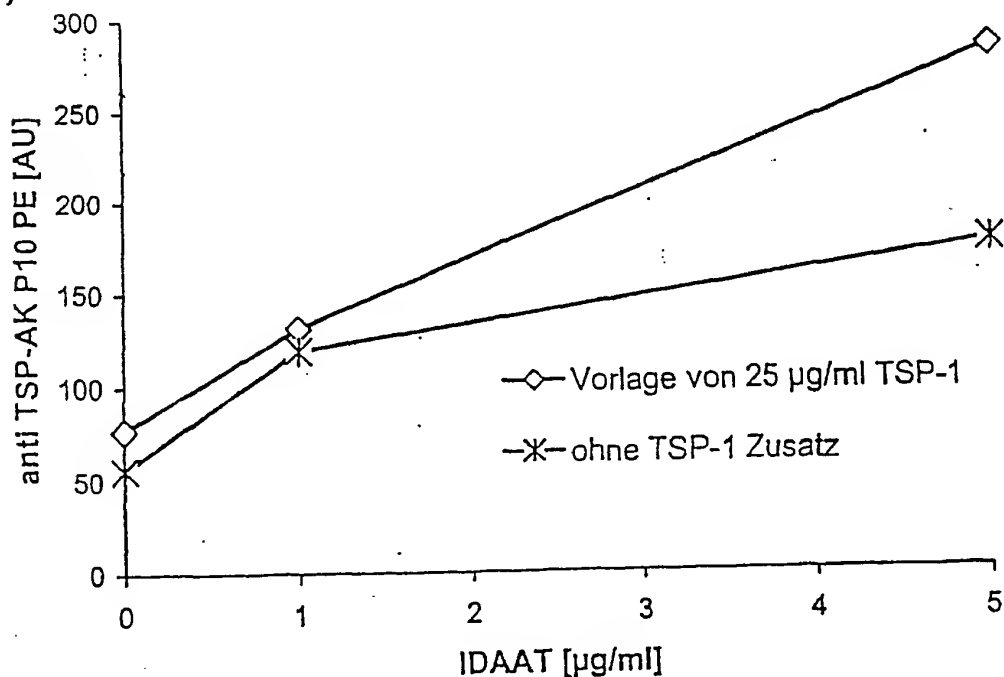


Fig. 7:

IDAAT verstärkt die aktivierende Wirkung von fLMF auf den oxidativen Burst von PMNL

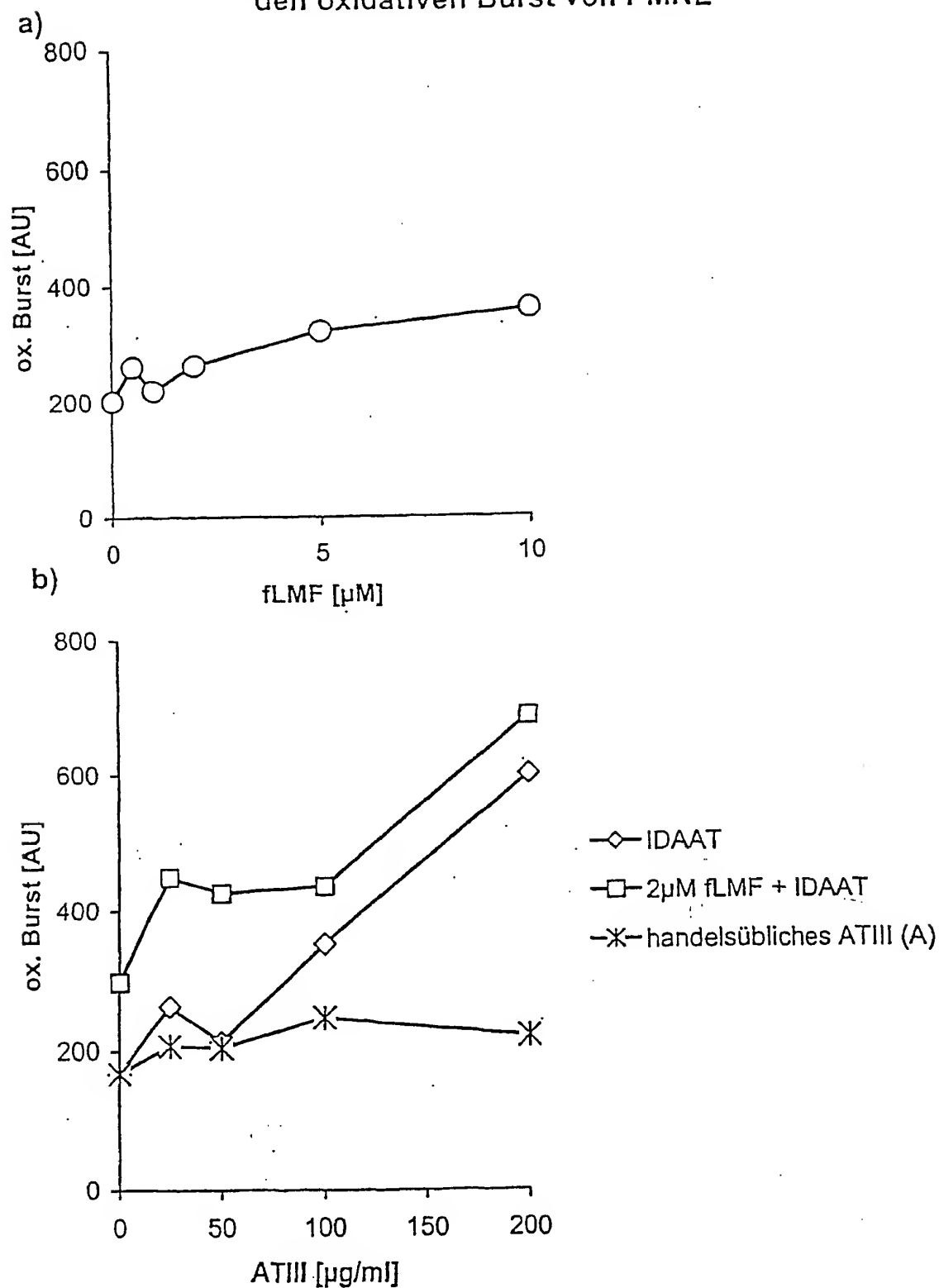


Fig. 8:

IDAAT inhibiert die Freisetzung von aktivem Interleukin 12 (IL-12) durch mit Interferon γ + *S. aureus* aktivierte Monozyten

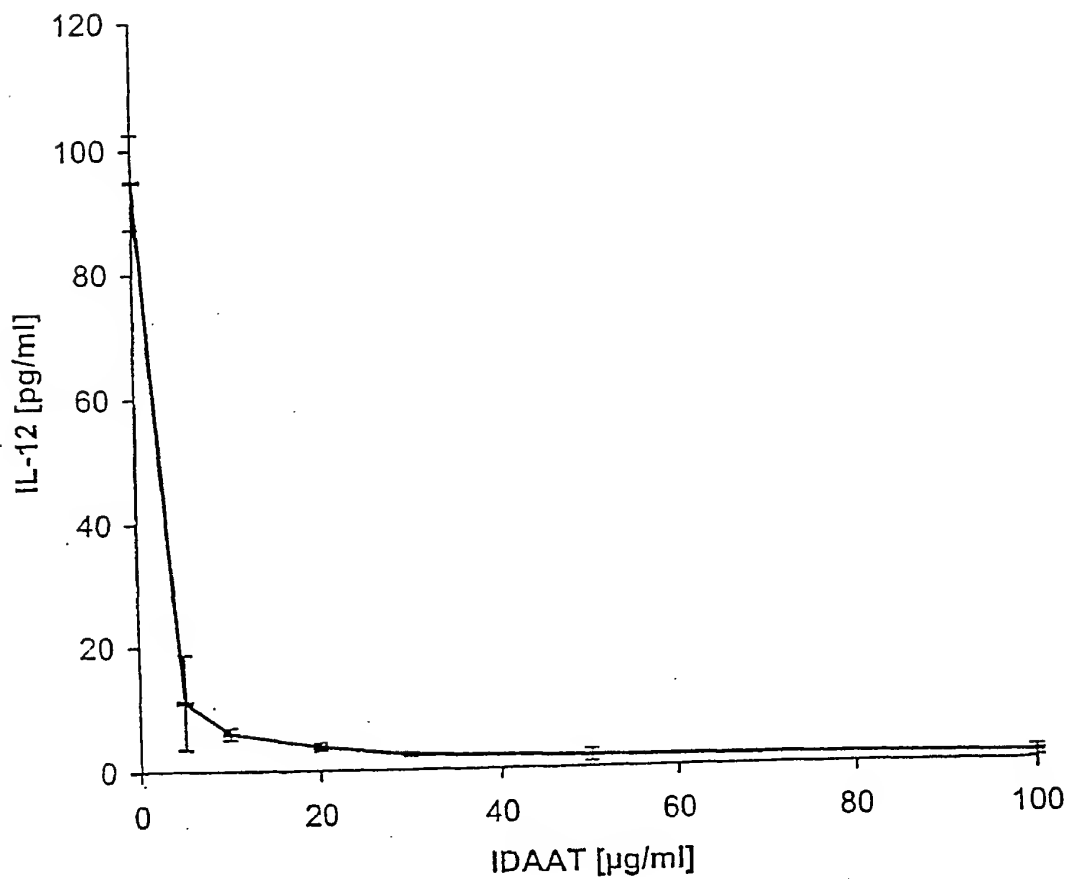


Fig 9:

IDAAT steigert die IL-10 Sekretion durch mit *S. aureus* und Interferon gamma aktivierte Monozyten

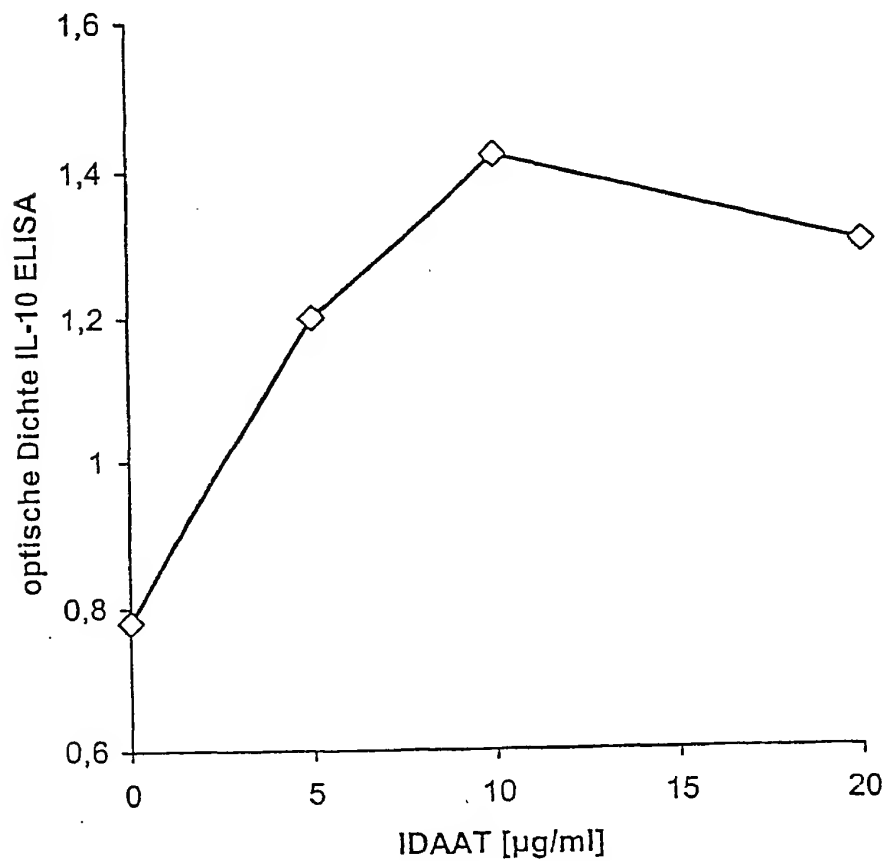
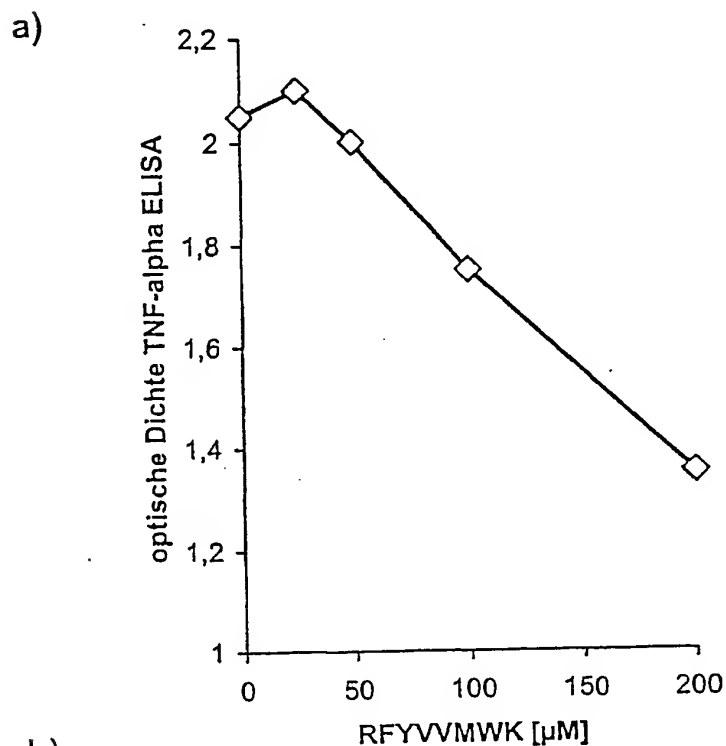


Fig 10:

IDAAT steigert die Inhibierung der TNF-alpha Sekretion
von aktivierten Monozyten durch das
TSP-1-Peptid RFYVVMWK



b)

TNF-alpha Sekretion von S.aureus und
Interferon gamma aktivierten Monozyten

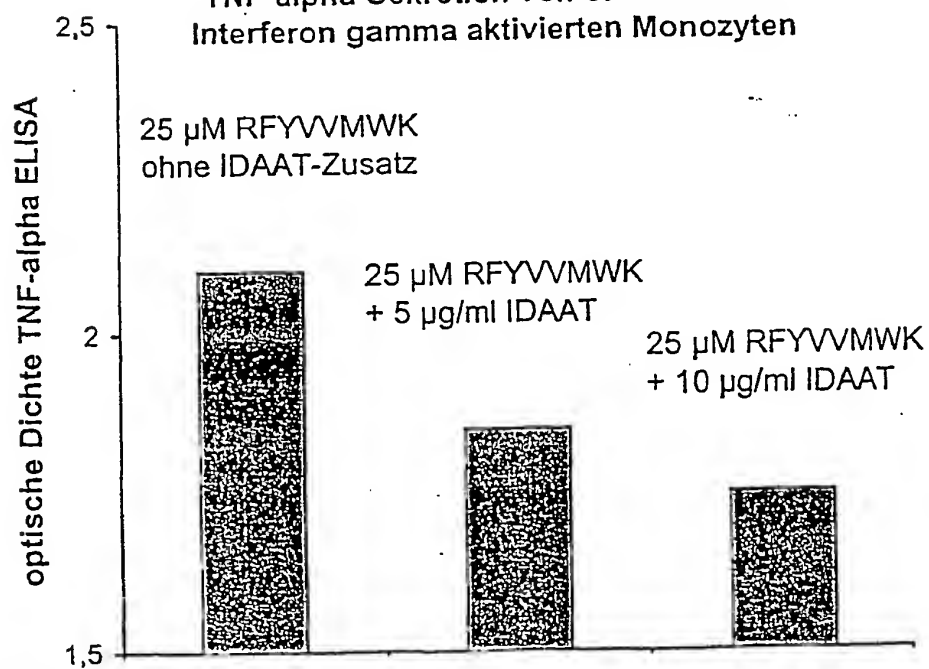
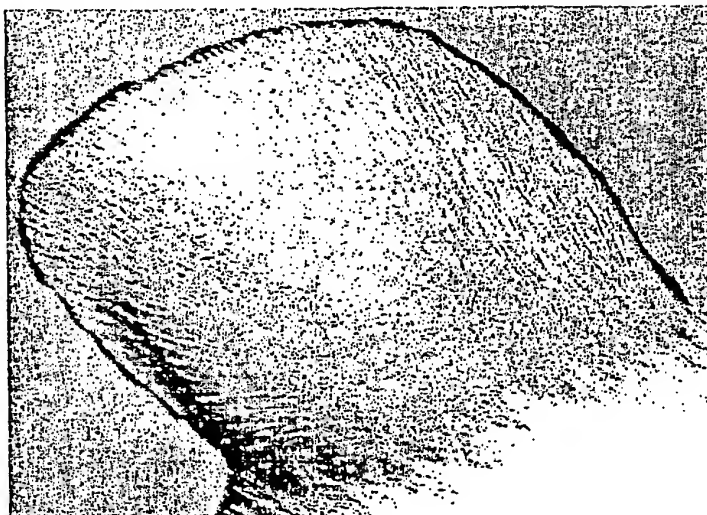


Fig 11:

a) IDAAT inhibiert Entzündungsreaktionen in vivo --- Arthus Reaktion



b)

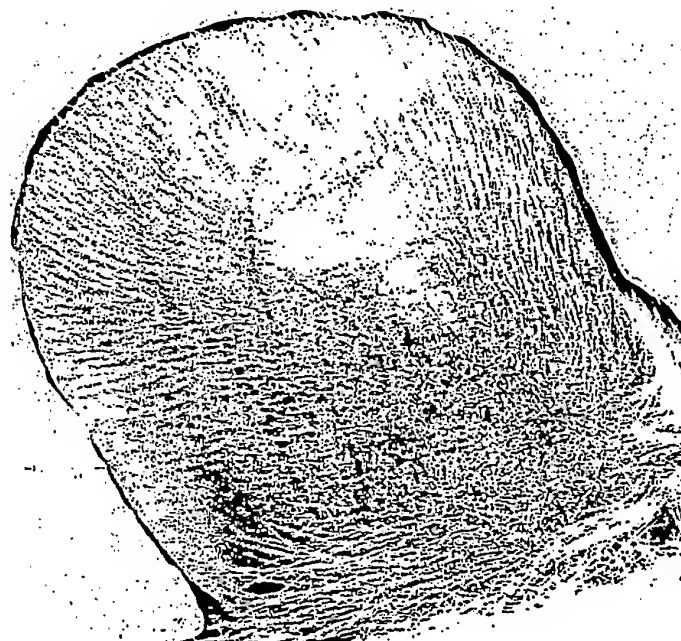


Fig 11

c)

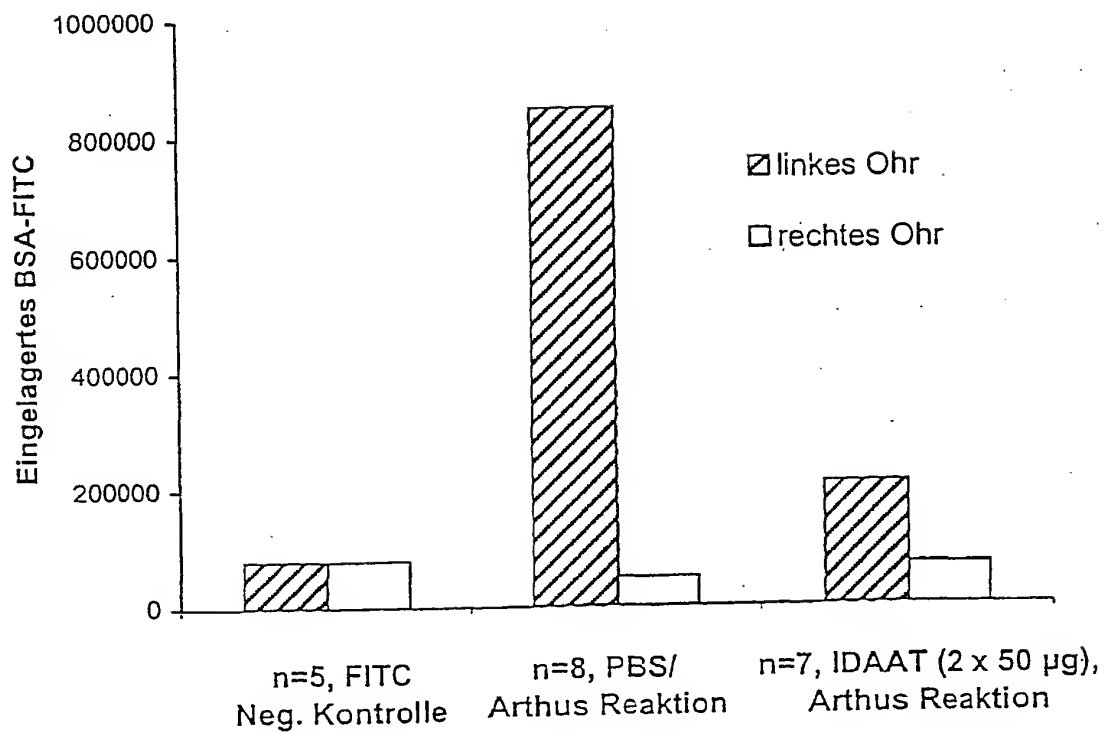


Fig 12:

IDAAT vermittelt die *S. aureus* Bindung an zur
Phagozytose und Bakterienabwehr fähige Zellen

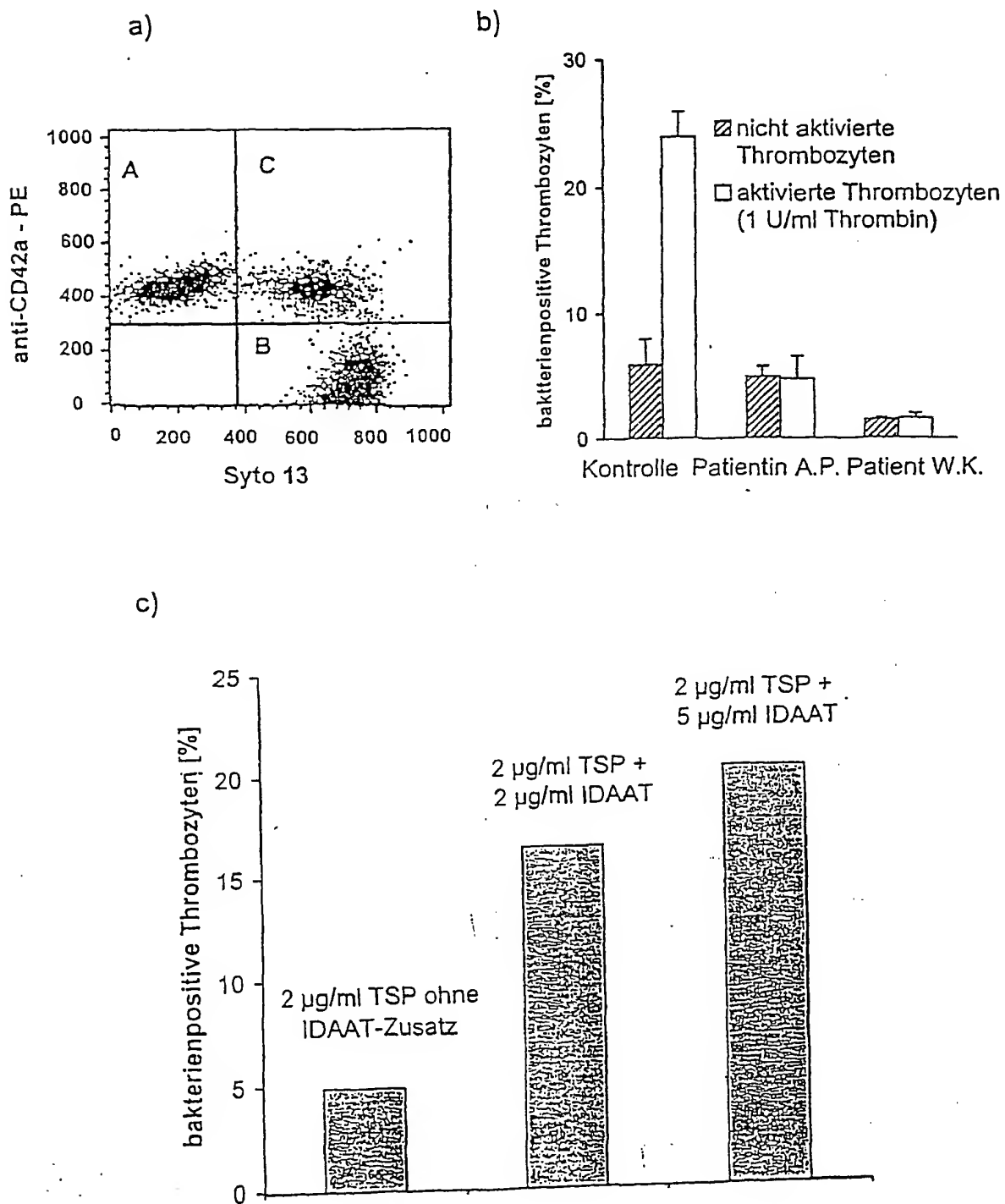


Fig 13:

IDAAT vermittelt die Bindung von Thrombospondin an
Thrombozyten

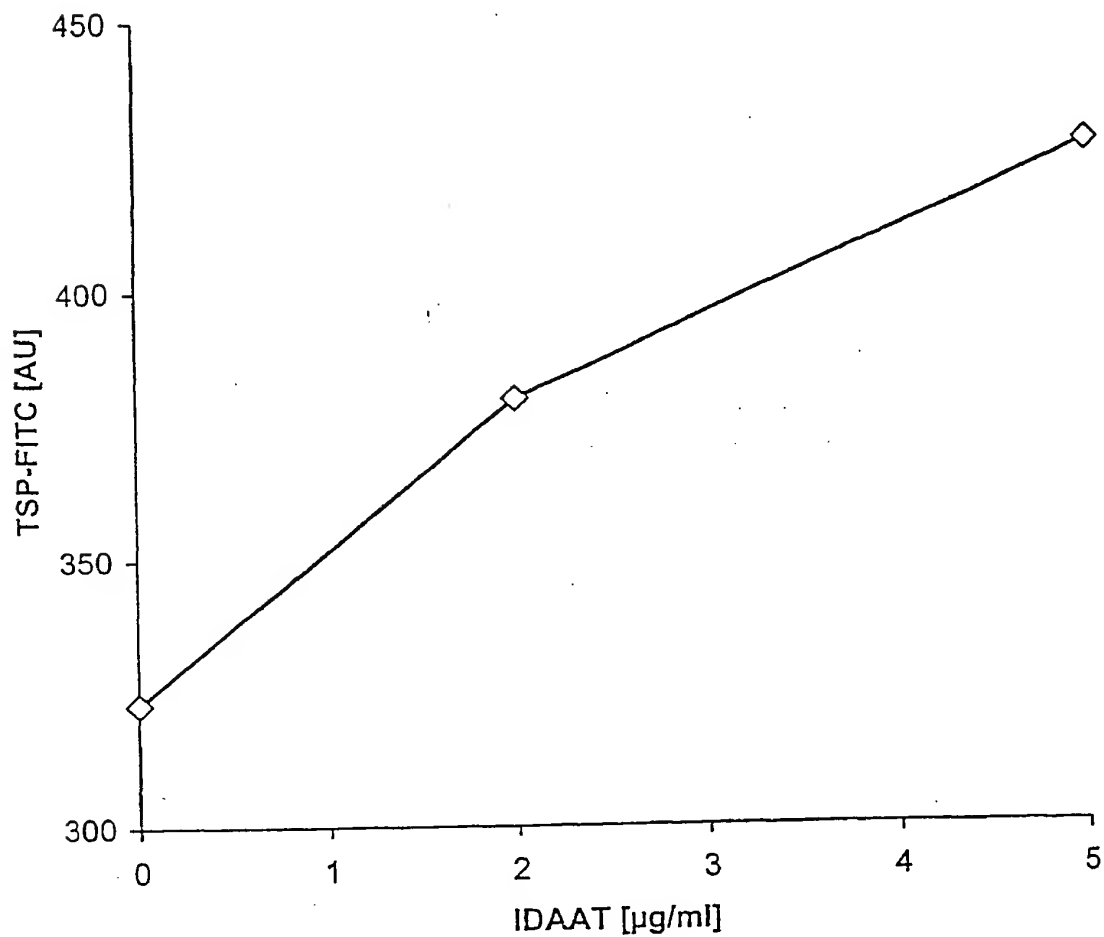
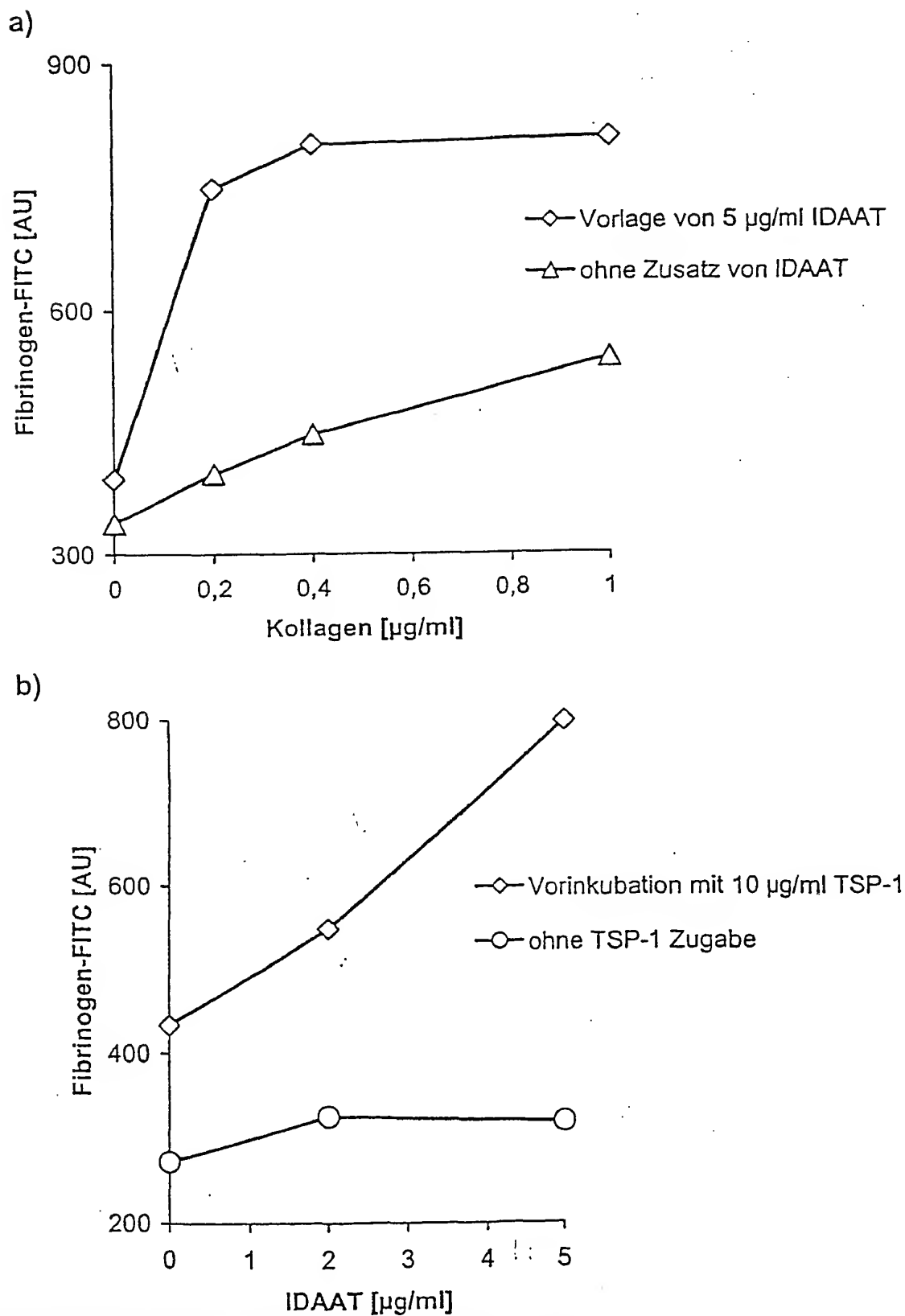


Fig 14:

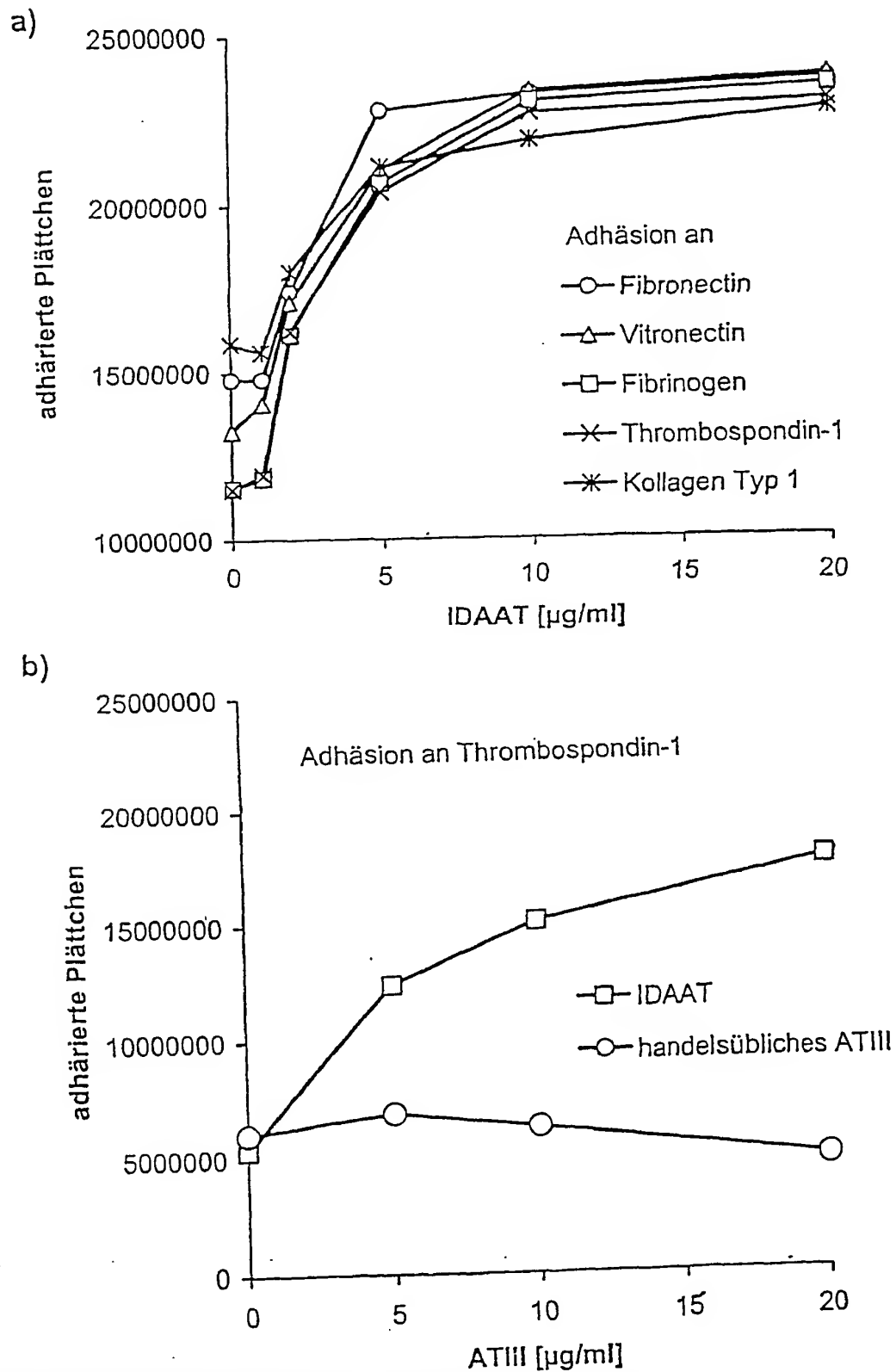
IDAAT fördert die Fibrinogen Bindung an Thrombozyten



ERSATZBLATT (REGEL 26)

Fig 15:

IDAAT steigert die Adhäsion von Thrombozyten an
Adhäsionsproteine



ERSATZBLATT (REGEL 26)

Fig 16:

IDAAT vermittelte Adhäsion von Thrombozyten ist Integrin-abhängig

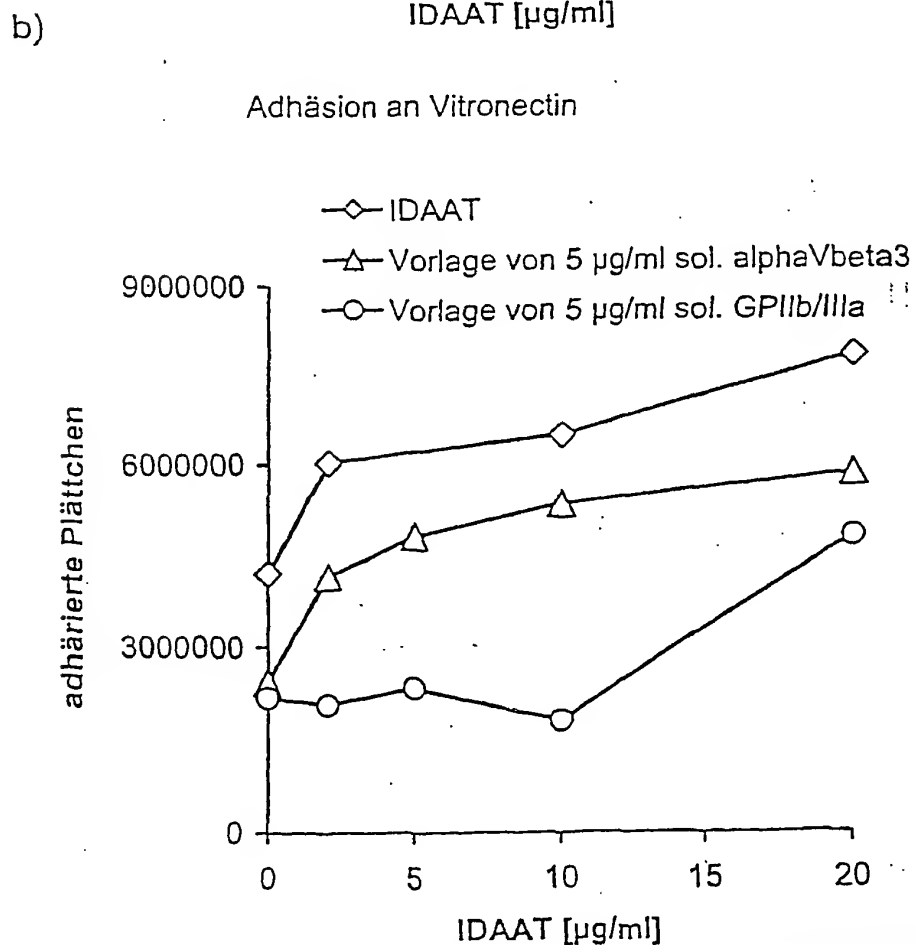
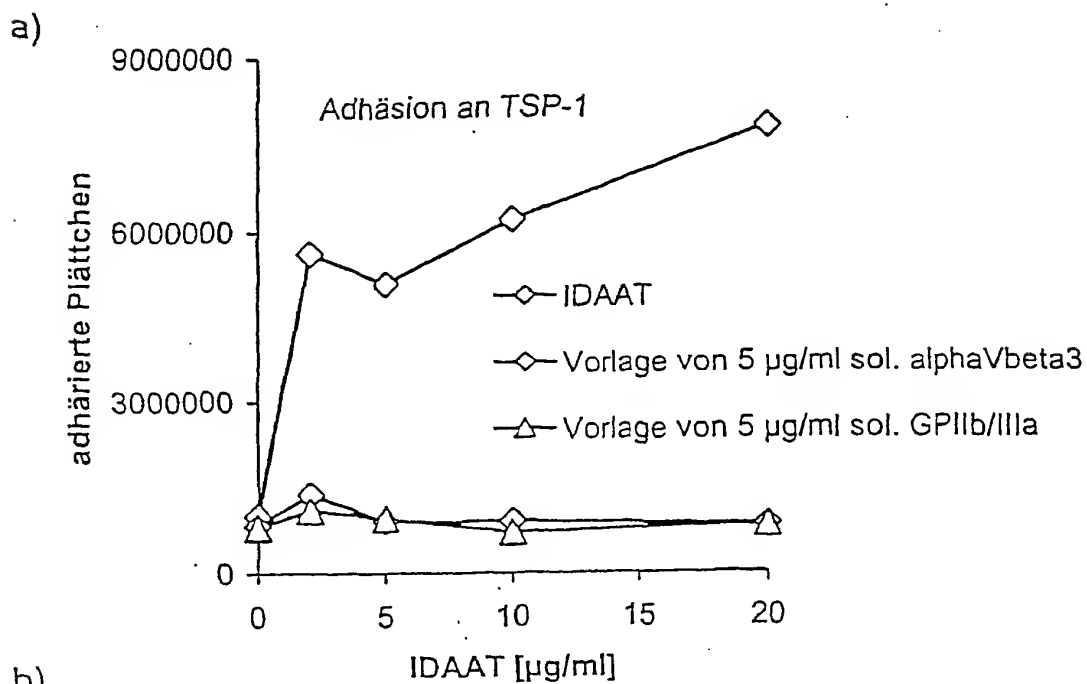


Fig 17:

Steigerung der Thrombozytenadhäsion durch IDAAT ist
CD36 vermittelt

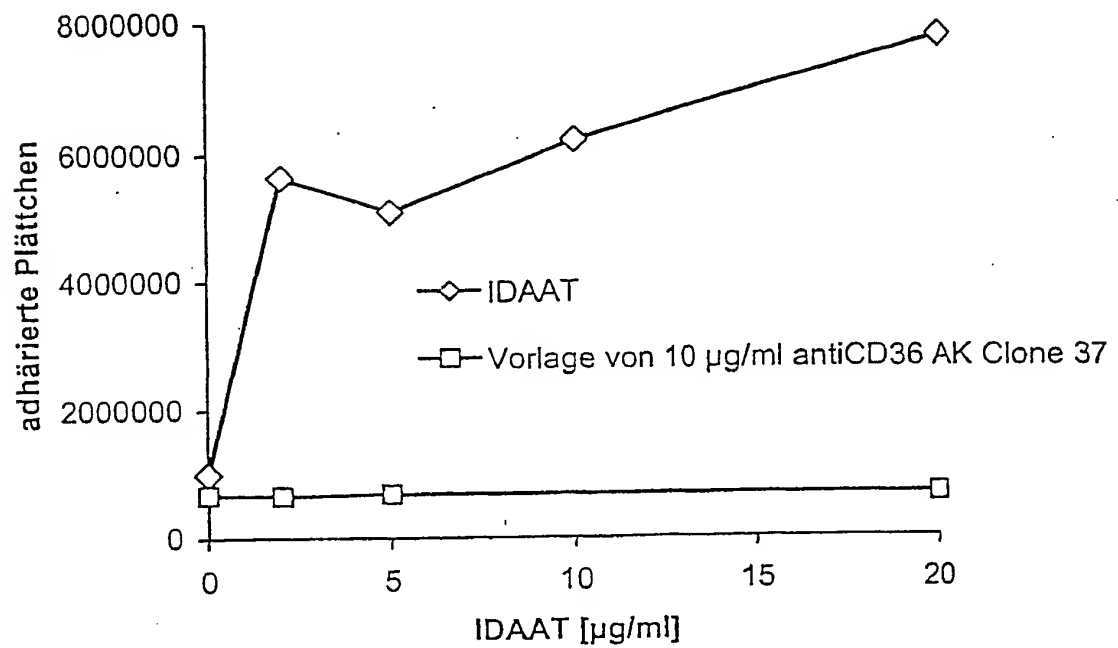


Fig 18:

Wirkung von IDAAT ist Thrombin-unabhängig

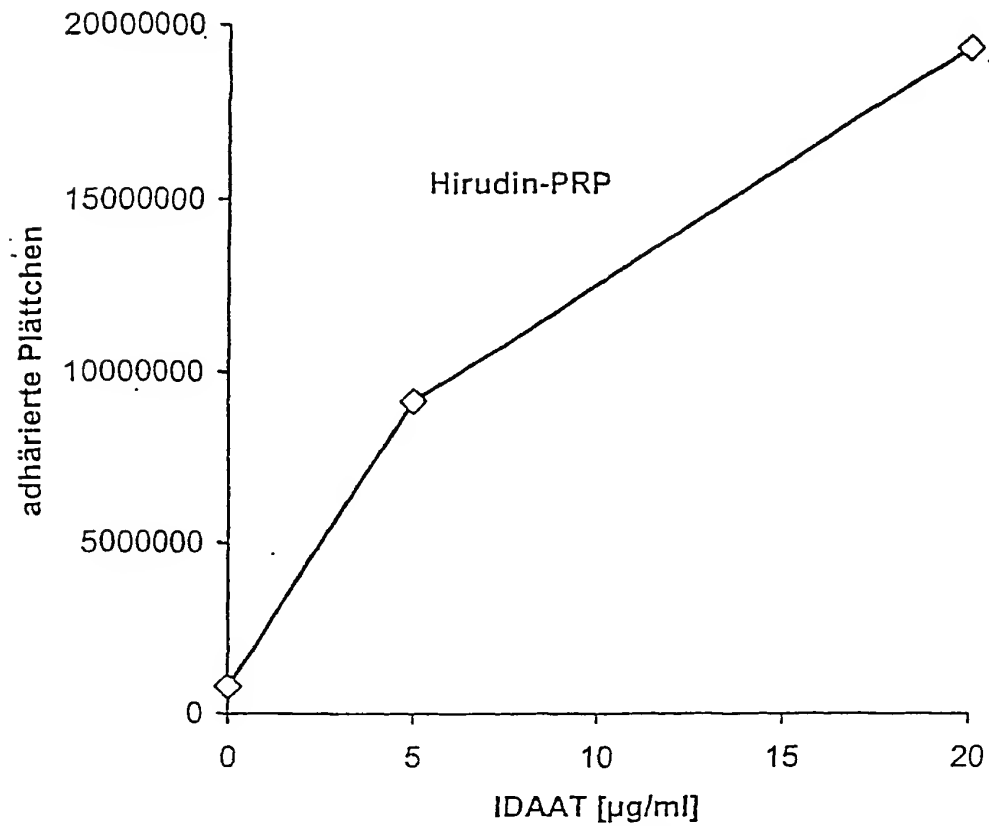


Fig.19:

IDAAT vermittelte Adhäsion von Thrombozyten ist abhängig von zweiwertigen Ionen

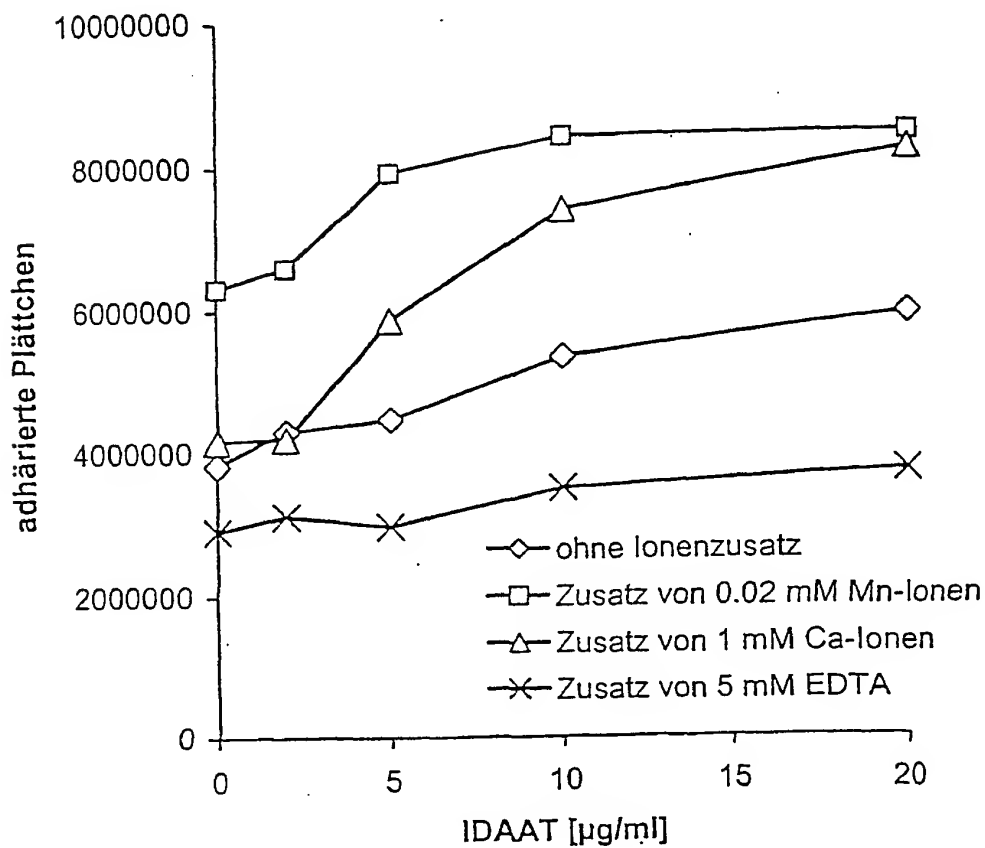


Fig 20:

Lösliches Thrombospondin-1 hemmt die
Thrombozytenadhäsion an Kollagen

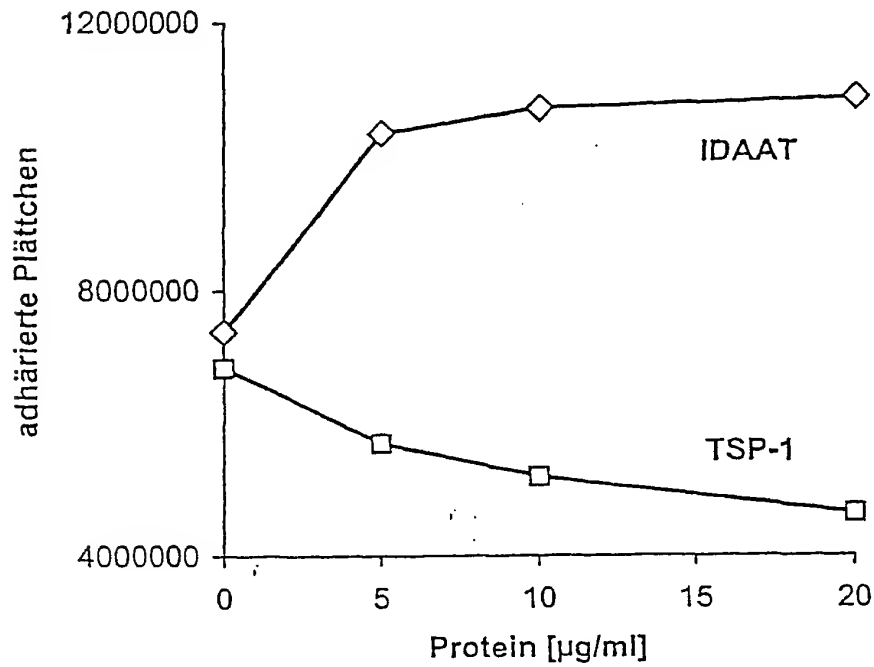


Fig 21:

Einfluß von Blutzellen auf die IDAAT vermittelte
Adhäsion von Thrombozyten

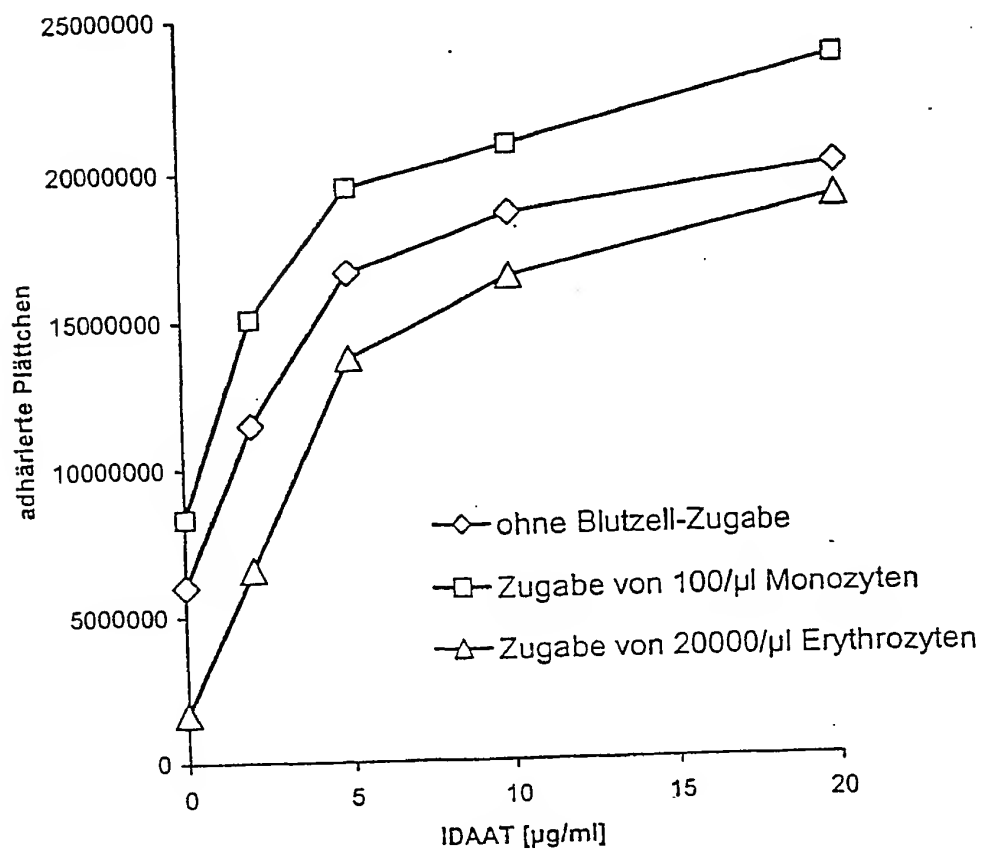


Fig 22:

Die IDAAT induzierte Thrombozytenadhäsion wird durch Inhibitoren der PI-3-Kinase gehemmt

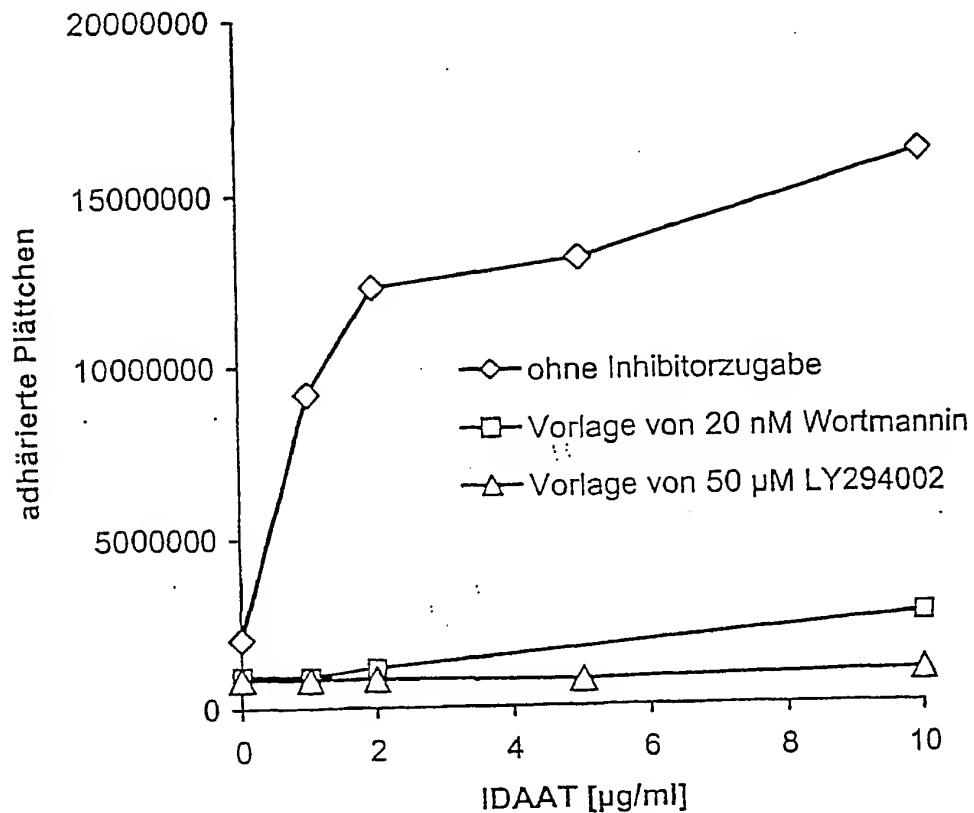


Fig 23:

IDAAT vermittelt die Thrombospondin medierte
Thrombozytenaggregation

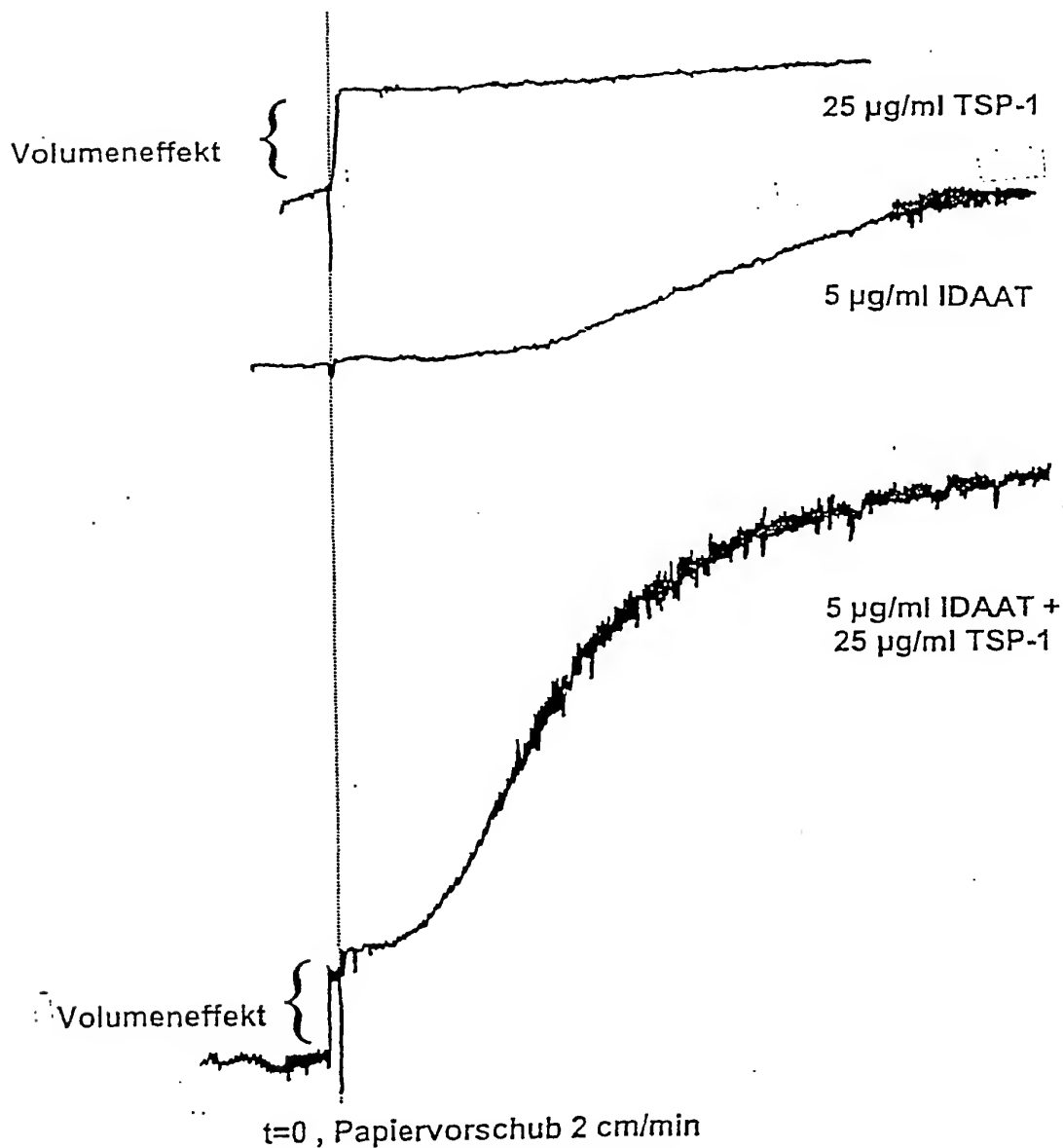


Fig 24:

IDAAT vermittelt die Mikropartikelbildung von
Thrombozyten

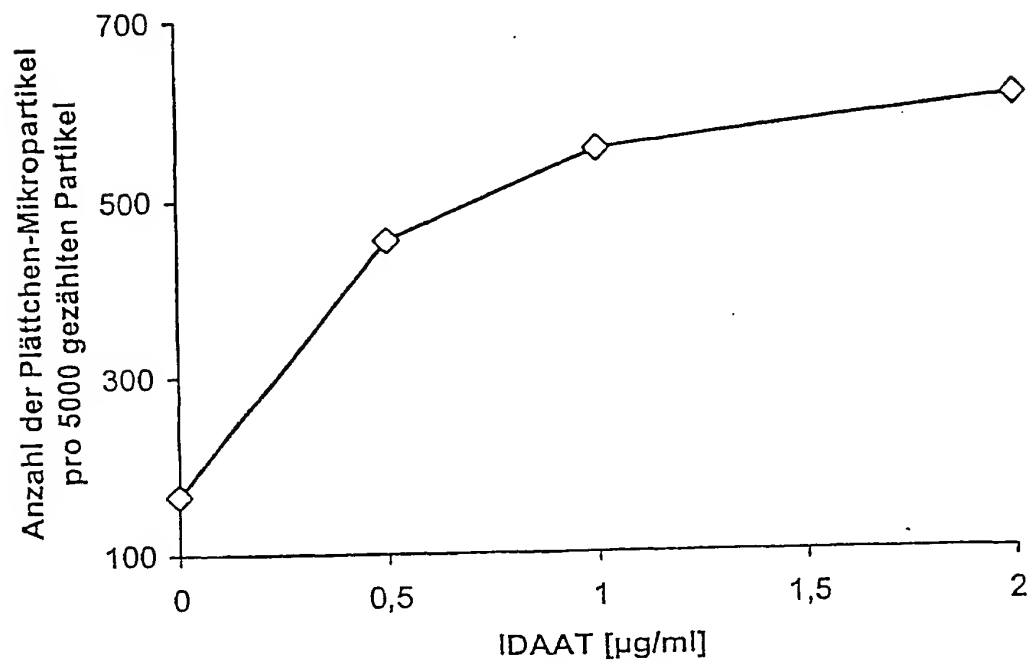
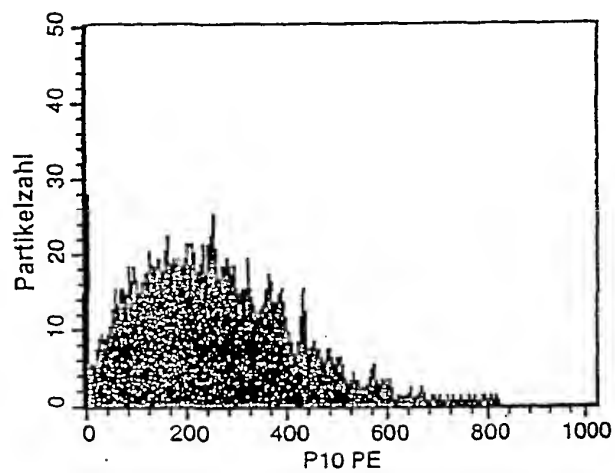


Fig 25:

IDAAT vermittelt die Thrombospondin-1 Bindung
an Endothelzellen

a)



25 µg/ml TSP-1

b)

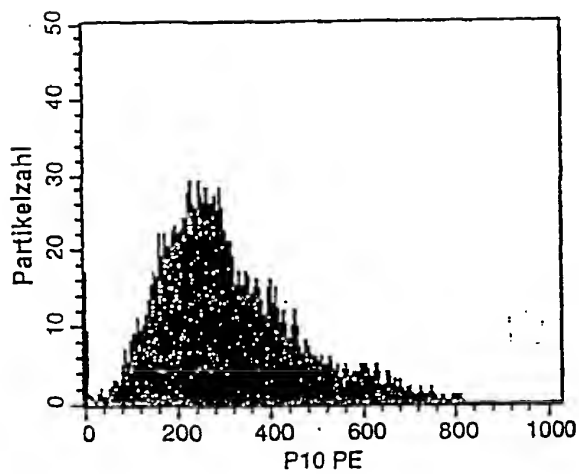
25 µg/ml TSP-1 +
5 µg/ml IDAAT

Fig 26:

IDAAT steigert die Bindung von Thrombozyten an
Vitronectin-ummantelte Latex-Beads

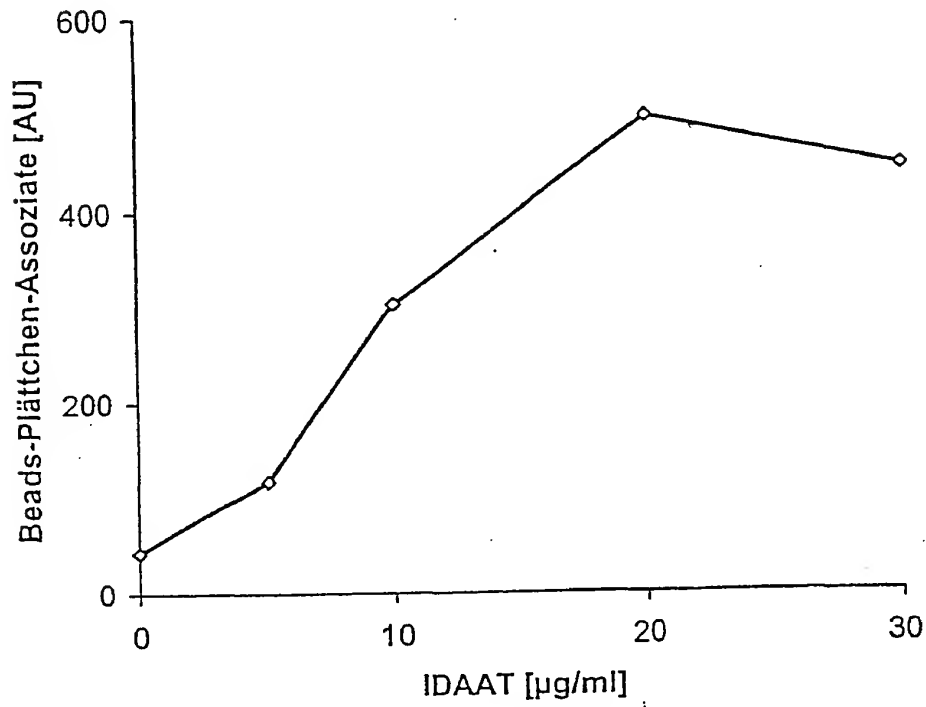
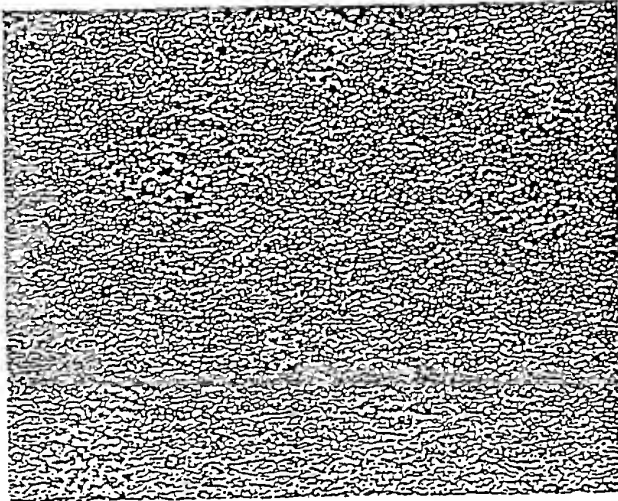


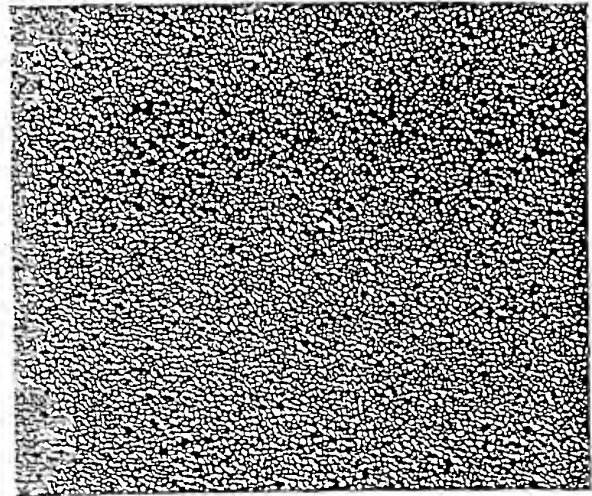
Fig 27:

IDAAT besteht aus polymerisiertem Antithrombin,
IDAAT bindet Thrombospondin

a) IDAAT



b) Handelsübliches ATIII (K)



c) IDAAT bindet TSP-1

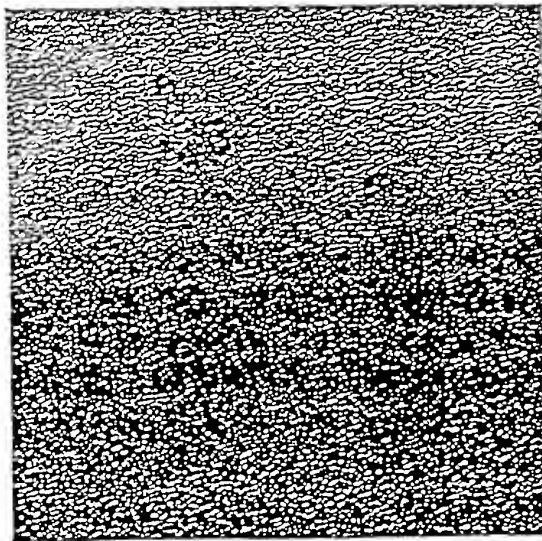
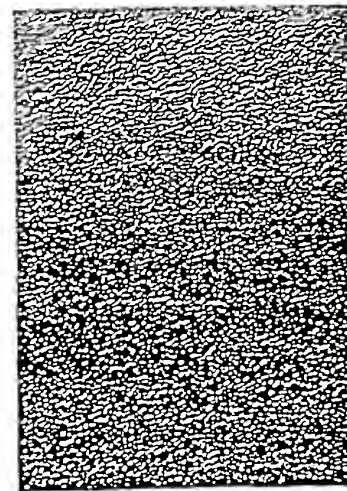
d) Handelsübliches ATIII (K)
bindet TSP-1 nicht

Fig 28

IDAAT bindet an rec. CD4

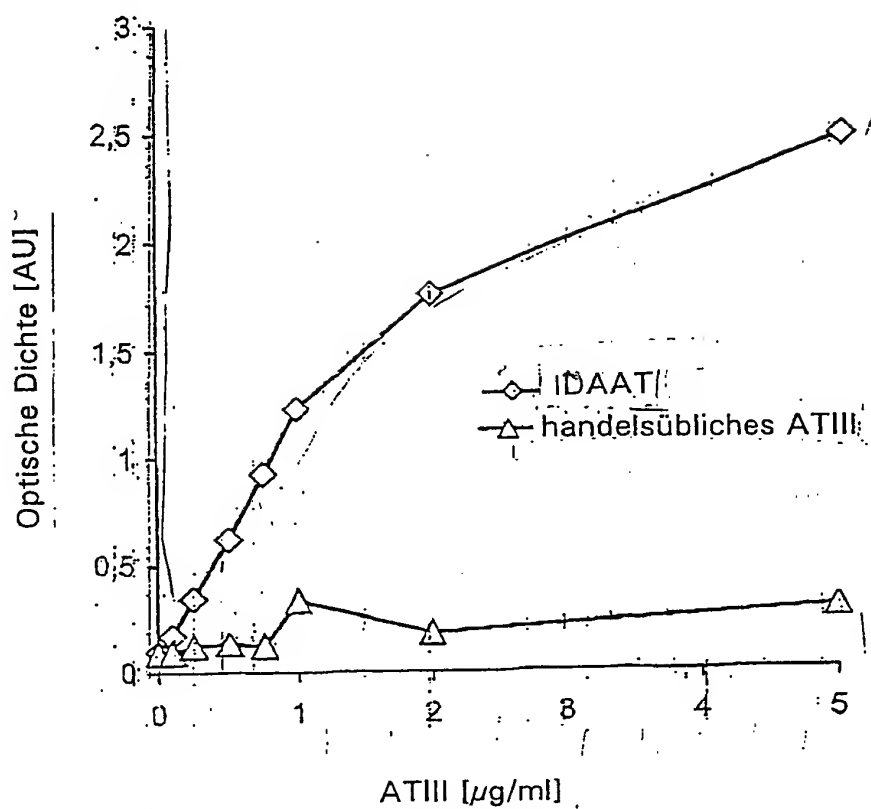


Fig 29

IDAAT bindet an rec. HIV-GP 120

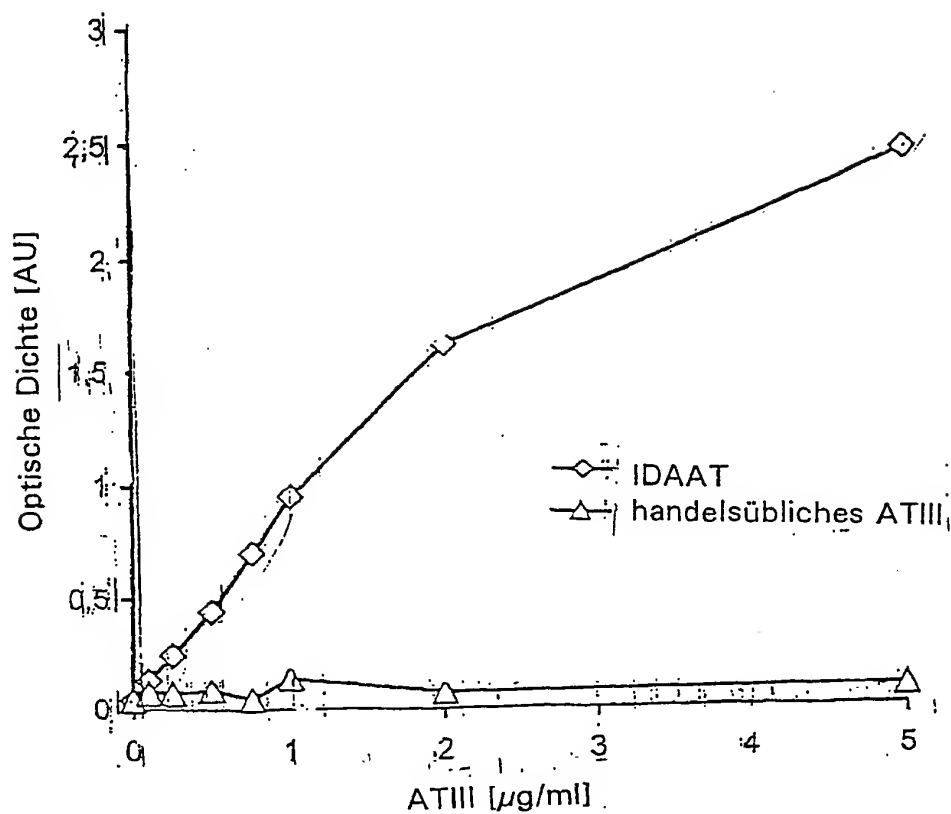


Fig 30

IDAAT bindet direkt an Thrombospondin

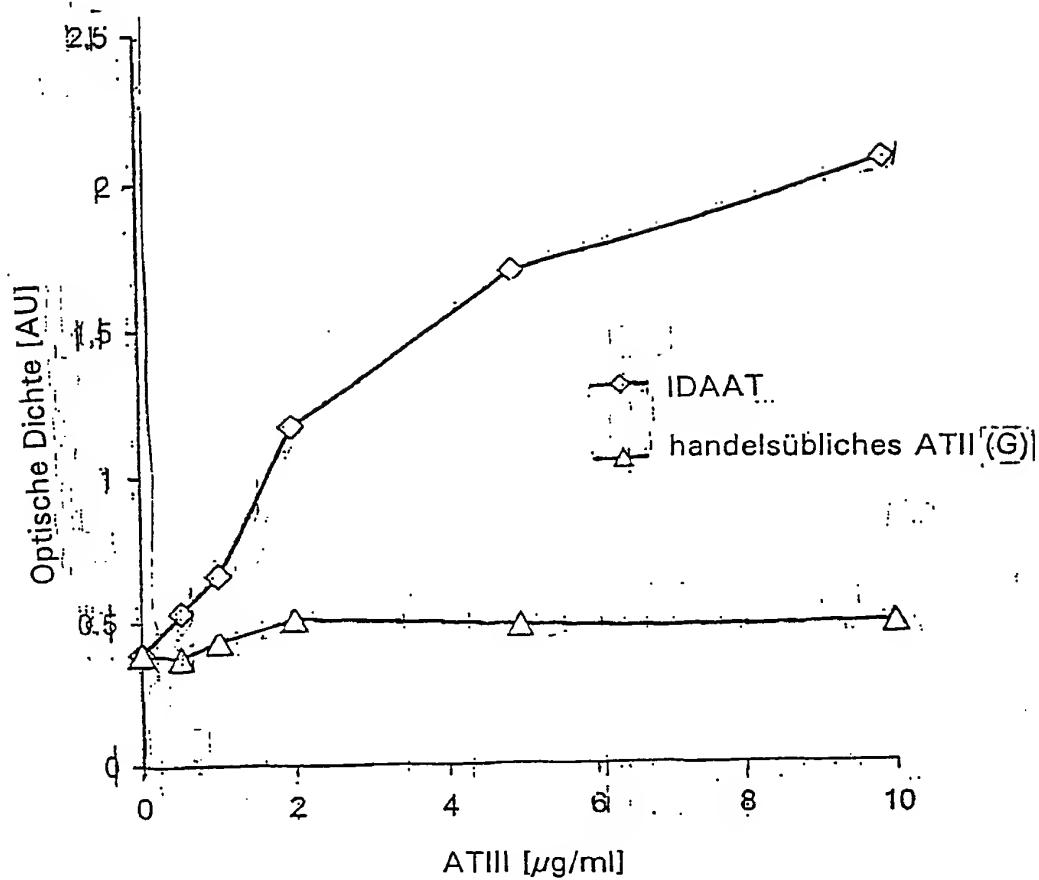
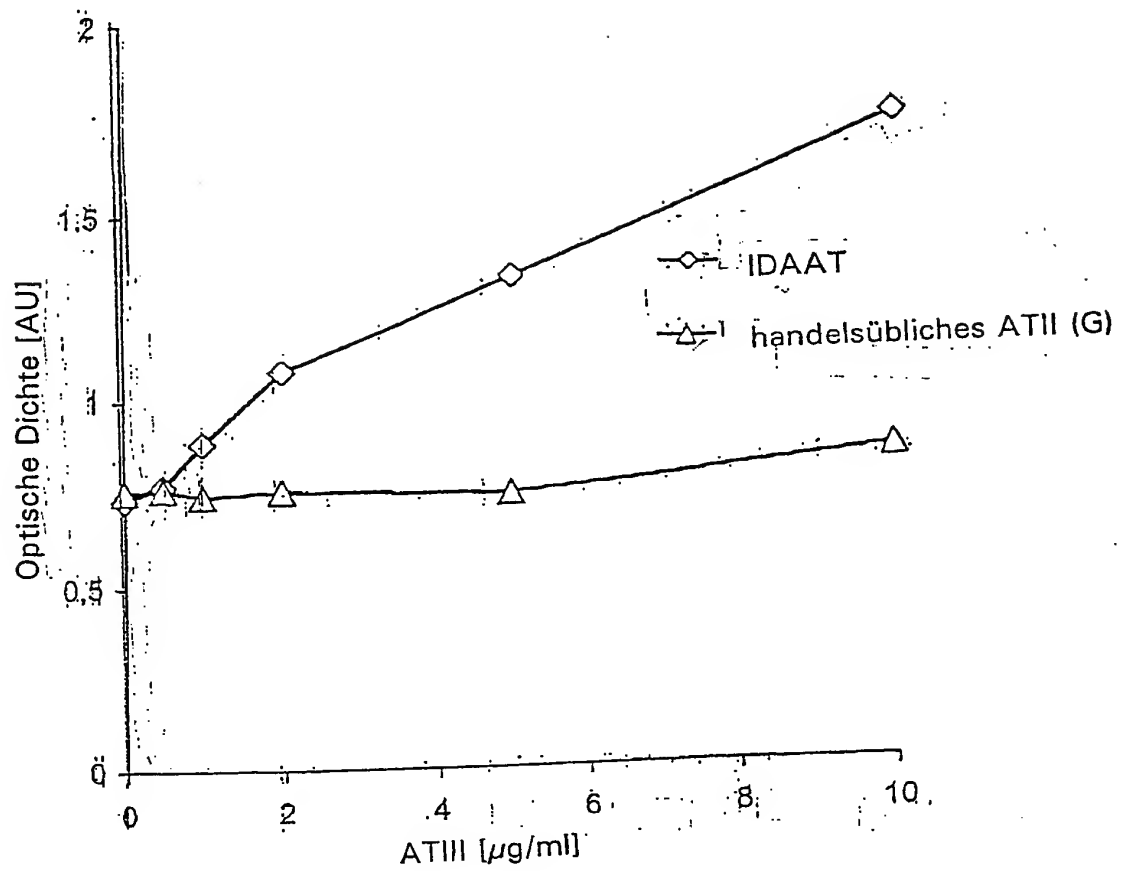


Fig 31

IDAAT bindet direkt an Vitronectin



3/5/1

DIALOG(R) File 351:Derwent WPI
(c) 2003 Thomson Derwent. All rts. reserv.

014574908

WPI Acc No: 2002-395612/200243

XRAM Acc No: C02-111535

Pharmaceutical formulation, useful for prevention or treatment of acute infection and sepsis, comprises activated anti-thrombin (III) (IDAAT), IDAAT peptide, -analogue or -mimetic

Patent Assignee: KEHREL B (KEHR-I)

Inventor: BRODDE M; KEHREL B

Number of Countries: 097 Number of Patents: 003

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week
DE 10045047	A1	20020321	DE 1045047	A	20000912	200243 B
AU 200189876	A	20020326	AU 200189876	A	20010912	200251
WO 200222150	A2	20020321	WO 2001EP10541	A	20010912	200270

Priority Applications (No Type Date): DE 1045047 A 20000912

Patent Details:

Patent No	Kind	Lan	Pg	Main IPC	Filing Notes
DE 10045047	A1	26		A61K-038/55	
AU 200189876	A			A61K-038/00	Based on patent WO 200222150
WO 200222150	A2	G		A61K-038/00	

Designated States (National): AE AG AL AM AT AU AZ BA BB BG BR BY BZ CA CH CN CO CR CU CZ DE DK DM DZ EC EE ES FI GB GD GE GH GM HR HU ID IL IN IS JP KE KG KP KR KZ LC LK LR LS LT LU LV MA MD MG MK MN MW MX MZ NO NZ PH PL PT RO RU SD SE SG SI SK SL TJ TM TR TT TZ UA UG US UZ VN YU ZA ZW
Designated States (Regional): AT BE CH CY DE DK EA ES FI FR GB GH GM GR IE IT KE LS LU MC MW MZ NL OA PT SD SE SL SZ TR TZ UG ZW

Abstract (Basic): DE 10045047 A1

NOVELTY - A pharmaceutical formulation (I) comprises activated anti-thrombin (III) (IDAAT), IDAAT peptide, -analogue or -mimetic.

DETAILED DESCRIPTION - An INDEPENDENT CLAIM is also included for a process for the production of IDAAT comprising:

(1) oxidization, decomposition or denaturing of anti-thrombin (III) and coupling with peptides; or

(2) polymerization of anti-thrombin (III).

ACTIVITY - Antibacterial; Virucide; Antifungal; Antiallergic; Antiinflammatory; Cytostatic; Vulnerary; Immunostimulant; Anti-HIV; Thrombolytic; Anticoagulant; Antiparasitic; Antimalarial; Vasotropic. No biological test data provided in specification.

MECHANISM OF ACTION - Antiangiogenic. No biological test data provided in specification.

USE - The formulation (I) is useful for the prevention of treatment of acute infection, sepsis, acute, chronic and/or allergic inflammation reactions, tumor growth and metastasis, angiogenesis disorder, leukemia, for the improvement of wound healing, for the treatment of lesions, for the inhibition of tissue inflammation and general enhancement of the immune system, for the treatment of HIV infection, chronic lymphatic leukemia, polytrauma, burns, thrombosis, anticoagulation therapy, reperfusion, organic transplant or parasitic infection, preferably malaria (claimed).

ADVANTAGE - The formulation (I) has a high absorption capacity under pressure, high permeability and good retention capacity.

pp; 26 DwgNo 0/0
Title Terms: PHARMACEUTICAL; FORMULATION; USEFUL; PREVENT; TREAT; ACUTE;
INFECT; SEPTIC; COMPRISE; ACTIVATE; ANTI; THROMBIN; PEPTIDE; ANALOGUE;
MIMIC
Derwent Class: B04
International Patent Class (Main): A61K-038/00; A61K-038/55
File Segment: CPI

3/5/2
DIALOG(R) File 351:Derwent WPI
(c) 2003 Thomson Derwent. All rts. reserv.

013720080
WPI Acc No: 2001-204310/*200121*
XRAM Acc No: C01-060850

Use of antithrombin III for the treatment of illnesses, especially immune
complex-mediated autoimmune and degenerative nervous system diseases,
viral infections and allergic disorders
Patent Assignee: AVENTIS BEHRING GMBH (AVET); CENTEON PHARMA GMBH
(CENT-N)

Inventor: ROEMISCH J; STAUSS H
Number of Countries: 029 Number of Patents: 006
Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week	
EP 1075840	A2	20010214	EP 2000114354	A	20000705	200121	B
AU 200051955	A	20010215	AU 200051955	A	20000811	200121	
DE 19937656	A1	20010215	DE 1037656	A	19990813	200121	
CA 2315588	A1	20010213	CA 2315588	A	20000811	200122	
JP 2001064200	A	20010313	JP 2000243517	A	20000811	200130	
KR 2001050056	A	20010615	KR 200046594	A	20000811	200171	

Priority Applications (No Type Date): DE 1037656 A 19990813

Patent Details:

Patent No	Kind	Lan	Pg	Main IPC	Filing Notes
EP 1075840	A2	G	6	A61K-038/57	
Designated States (Regional): AL AT BE CH CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT					
LI LT LU LV MC MK NL PT RO SE SI					
AU 200051955	A			A61K-038/57	
DE 19937656	A1			A61K-038/57	
CA 2315588	A1	E		A61K-038/57	
JP 2001064200	A		4	A61K-038/55	
KR 2001050056	A			A61K-035/16	

Abstract (Basic): *EP 1075840* A2

NOVELTY - Treatment and prevention of illnesses with antithrombin
III is new.

DETAILED DESCRIPTION - Antithrombin III (AT III) is used to treat
and prevent oncological, immune complex-mediated, autoimmune, fibrotic
and granulomatous diseases, allergic disorders, diseases associated
with neovascularization, degenerative diseases of the nervous system,
arteriosclerosis, viral infections, acute inflammations and trauma.

ACTIVITY - Antiinflammatory; Cytostatic; Immunosuppressive;
Dermatological; Antirheumatic; Antiarthritic; Virucide; Anti-HIV;
Antiallergic; Antiasthmatic; Ophthalmological; Nootropic;
Neuroprotective; Vasotropic; Respiratory; Antigout; Hepatotropic;
Antiarteriosclerotic.